

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Departamento de Termodinâmica**

**PURIFICAÇÃO DE SAPONINAS DE
EXTRATOS DE QUILAIA USANDO
FRACIONAMENTO EM COLUNA DE
ESPUMA**

**Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia
Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestre**

Autora: Lídia Oazem de Oliveira da Costa

Orientador: Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Janeiro-1999

Campinas – São Paulo- Brasil



9905587

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
Ex.	
BC/3+389	
229,99	
C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/04/99
N.º CPD	

CM-00122660-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C823p

Costa, Lídia Oazem de Oliveira da

Purificação de saponinas de extratos de quilaia usando fracionamento em coluna de espuma. / Lídia Oazem de Oliveira da Costa--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Theo Guenter Kieckbusch

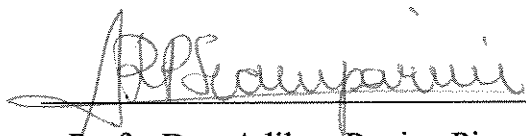
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Saponinas - Purificação. 2. Espuma. 3. Tensão superficial. I. Kieckbusch, Theo Guenter. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Esta dissertação foi defendida e aprovada no dia 21 de Janeiro de 1999, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch



Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini



Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela Eng. Lúdia Oazem de Oliveira da Costa e aprovada pela banca examinadora em 21 de Janeiro de 1999.



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch

Existem momentos em nossas vidas que pensamos em desistir, mas existe uma força maior chamada Deus que nos segura e nos cerca de pessoas importantes para nos amparar:

Agradeço:

a mês avós Zelina e Isaías (em memória)

Aos meus pais Marly e Vêdy

Ao meu irmão Verdi

À amiga Ruth

Pela ajuda, pela presença e pela força.

Ao meu marido, Carlos Alberto, que entrou em minha vida trazendo disciplina, coragem e perseverança e me deu minha filha, Ana Luíza.

Ana Luíza com seu nascimento trouxe alegria e ingenuidade por mim esquecida e encheu minha vida de muita esperança e confiança.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr Theo Guenter Kieckbusch pela orientação, força de vontade, paciência e otimismo para execução e qualidade do trabalho.
- À Prof^a Maria Helena Miguel que sugeriu a idéia do processo e sempre esteve disposta a orientar todas as dúvidas surgidas.
- Ao Dr. Paulo Rosa que contribuiu com valiosas sugestões apresentadas ao trabalho.
- Ao Dr. Prof .Dr. César Santana pela ajuda inicial para confecção da coluna de fracionamento e por permitir a realização de muitos ensaios instrumentais em seu laboratório...
- Ao Prof. Dr. Rahoma Mahomed, pelo apoio dado para realização em conjunto do Projeto Fapesp permitindo o compartilhamento do laboratório, do material e a motivação para execução do trabalho.
- Ao corpo técnico da FEQ, Levi, Celso e Fábio, e à Augusto Endo, aluno de Iniciação científica, que contribuíram para a realização dos experimentos.
- Ao CNPQ pela bolsa de estudos e a FAPESP pelo financiamento do projeto, obrigada por tonarem viável a pesquisa.
- Aos amigos Alessandro Dibb, principalmente pelo companheirismo no início do mestrado, Marleny Doris Saldanã Aranda, Danuzia, Edna Santiago Benta, Pedro de Alcantra Pessoa e Eduardo Pereira pela ajuda as solicitações pedidas e o apoio em todos os momentos que passamos juntos.

RESUMO

As saponinas de quilaia tem utilização como aditivos na indústria de alimentos e de fármacos principalmente como potencializadores de vacinas. A viabilidade técnica do uso de extratos contendo *quillaja saponaria molina* como princípio ativo na redução do teor de colesterol do óleo de manteiga já foi demonstrada em pesquisas na Faculdade de Engenharia Química e Faculdade de Engenharia Alimentos na UNICAMP.

Os extratos de quilaia disponíveis tem variado grau de purificação contendo também taninos, proteínas, carboidratos e açúcares. A Concentração Micelar Crítica, CMC, desse extrato, determinada a 3 níveis de pH por meio do Método da Placa de Wilhelmy, mostrou os seguintes valores: 198 mg/L (pH 3,0); 347 mg/L (pH 5,0) e 388 mg/L (pH 7,0) a 25° C.

Extratos de quilaia foram purificados usando a técnica de fracionamento por espuma operando em processo semi-batelada. Utilizou-se uma coluna (diâmetro: 2,81 cm; altura: 182 cm) dotada de placa de vidro sinterizado para produção de bolhas. O gás de arraste era nitrogênio, a uma vazão de 22,60 mL/min. A coluna era carregada até uma altura de 152 - 158 cm de solução.

Soluções aquosas de quilaia a uma concentração inicial, abaixo, acima e na CMC e nos pHs 3,0; 5,0 e 7,0 foram fracionadas por espuma e a eficiência de purificação foi avaliada.

A eficiência do processo foi monitorada através da determinação do peso seco, da variação da tensão superficial com as diluições sucessivas do espumado, e pela absorvância, lida entre 190 a 240 nm. O processo mostrou-se inviável a concentrações acima da CMC, devido ao grande arraste da solução. A redução do pH e uma concentração inicial abaixo da CMC aumenta o enriquecimento de saponinas na fase espuma e esgota todos os tensoativos da solução original. Dentre as condições estudadas, os melhores resultados foram alcançados com 80 mg/L a pH 3,0, obtendo-se um enriquecimento superior a 10 vezes a concentração na solução inicial e um alto grau de purificação, esgotando todos os tensoativos da solução extraindo-se 23 % dos sólidos, valor que corresponde ao conteúdo original de saponinas no extrato.

Palavras chaves: Saponina, quilaia, fracionamento por espuma, purificação

ABSTRACT

Quillaja Saponins are widely used as additives in food and pharmaceutical industry, more recently as vaccines adjuvants. The technical viability of the use of *quillaja saponaria molina* extracts as a cholesterol solubilization agent from butter oil was already demonstrated in researches at Food of Engineering School and Chemical Engineering School at the State University of Campinas.

Commercial quillaja extracts have distinct degree of purification, with tanins, proteins, carbohydrates and sugars as other constituents. The Critical Micelle Concentration, CMC, of an extract was determined at 3 pH levels, using the Wilhelmy Plate Method, and the following values were found: 198mg/L (pH 3,0); 347 (pH 5,0) e 388 mg/L (pH 7,0), at 25° C.

Quillaja extracts were purified by foam fractionation in a semi-batch process. A glass column (diameter: 2,81 cm; height: 182 cm) with a sinterized porous glass as gas disperser was used. The gas used was nitrogen, at a flowrate of 22,60 mL/min. The liquid level in the column was 152 to 158 cm.

Quillaja aqueous solutions, at a concentration higher, equal or lower than the CMC, and at pHs of 3,0, 5,0 and 7,0 were foam-fractionated and the purification efficiency estimated.

The process efficiency was monitored by measuring the dry mass, the surface tension change with successive dilutions of the collapsed foam phase and the absorbancy, read at 190 – 240 nm. The process was not feasible at concentrations higher than the CMC, due to large solution entrainment. Low pH and an initial quillaja concentration lower than the CMC increases the saponin enrichment in the foam phase and depleted all surface-active substances of the feed solution. Among the conditions tested, best results were obtained with a solution of 80 mg/L, at pH 3,0. A concentration enrichment 10 times higher than the initial solution concentration was obtained, with high degree of purification, depleting all surface-active components of the solution and extracting 23% of the solids, a value that corresponds approximately to the original saponin content of the extract.

SUMÁRIO

NOMENCLATURA -----	i
RESUMO -----	ii
ABSTRACT -----	iii
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DA LITERATURA -----	4
2.1 TRITERPENOS -----	4
2.1.1 Nomenclatura -----	4
2.2 SAPONINAS-----	6
2.2.1 Generalidades -----	6
2.2.2 O uso de saponinas -----	7
2.2.3 Conseqüências fisiológicas e nutricionais do uso de saponinas em alimentos -----	9
2.2.4 Descrição dos métodos de separação e purificação de saponinas -----	12
2.2.5 Determinação quantitativa de saponinas -----	15
2.3 SAPONINAS DE <i>QUILLAJA SAPONARIA MOLINA</i> -----	21
2.3.1 Propriedades e aplicações -----	21
2.3.2 Determinação quantitativa de saponinas de quilaia -----	24
2.4 SURFATANTES -----	29
2.4.1 Generalidades -----	29
2.4.2 Micelas -----	32
2.4.3 Propriedades da CMC -----	36
2.4.4 Interações de tensoativos com macromoléculas -----	40
2.4.5 Interações de saponinas-colesterol como processo de extração -----	42
2.5 FRACIONAMENTO POR ESPUMA -----	44
2.5.1 Espumas -----	44
2.5.2 Características e propriedades do fracionamento em colunas de bolhas e espumas -----	46
2.5.3 Aplicações do processo de adsorção em colunas de bolhas e espumas ---	52
2.5.4 Drenagem e coalescência no fracionamento por espuma -----	55

2.5.5 Adsorção na interface gás-líquido -----	57
3. MATERIAL, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO -----	59
3.1 MATERIAL -----	59
3.1.1 Saponinas -----	59
3.1.2 Reagentes e aditivos -----	60
3.1.3 Equipamentos e outros suprimentos -----	61
3.2 MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL -----	63
3.2.1 Pré-tratamento do extrato de quilaia -----	63
3.2.2 Preparo de soluções aquosas de quilaia -----	63
3.2.3 Determinação da concentração micelar crítica -----	63
3.2.4 Ensaios Preliminares -----	66
3.2.5 Ensaios Definitivos -----	70
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES -----	78
4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELIAR CRÍTICA (CMC) --	78
4.1.1 Escolha do método e do equipamento -----	78
4.1.2 Curva padrão da tensão superficial nos pHs 3,0, 5,0 e 7,0 -----	81
4.2 ENSAIOS COM FRACIONAMENTO POR ESPUMA -----	85
4.2.1 Ensaios preliminares -----	85
4.2.2 Solução aquosa de quilaia em pH 3,0 -----	96
4.2.3 Solução aquosa de quilaia em pH 5,0 -----	120
4.2.4 Solução aquosa de quilaia em pH 7,0 -----	141
5. CONCLUSÕES -----	161
6. SUGESTÕES -----	163
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	164
APÊNDICE A -----	174
APÊNDICE B -----	188
APÊNDICE C -----	190
APÊNDICE D -----	195

NOMENCLATURA

$A_e \Rightarrow$ área total de adsorção de espuma, cm^2

$A_i \Rightarrow$ área total de adsorção de S_i , cm^2

$A_r \Rightarrow$ área total de adsorção de S_r , cm^2

CMC \Rightarrow Concentração Micelar Crítica, mg/L

$h \Rightarrow$ altura da coluna de fracionamento, cm

$h_f \Rightarrow$ altura final da coluna de líquido no final do processo de formação de espuma, cm

$h_i \Rightarrow$ altura inicial da coluna de líquido no início da formação de espuma, cm

$L \Rightarrow$ leitura do rotâmetro

$M(S_i) \Rightarrow$ massa de sólidos na solução inicial, mg

$M(S_r) \Rightarrow$ massa de sólidos na S_r , mg

$M(S_e) \Rightarrow$ massa de sólidos na S_e , mg

$m_e \Rightarrow$ massa de espuma recolhida, g

$S_i \Rightarrow$ solução de extrato de quilaia que era colocada na coluna de fracionamento, chamada de solução inicial, mg/L .

$S_e \Rightarrow$ solução de espuma recolhida no fracionamento por espuma, mg/L

$S_r \Rightarrow$ solução que permanece na coluna de fracionamento após término da operação, chamada solução residual, mg/L

$t_f \Rightarrow$ tempo de fracionamento, horas

$T_s \Rightarrow$ Tensão Superficial, mN/m

$V_{sr} \Rightarrow$ volume final na coluna de fracionamento, volume de S_r , mL

$V_{si} \Rightarrow$ volume inicial de solução de extrato de quilaia que é alimentada a coluna, mL

$V_e \Rightarrow$ volume de espumado, mL

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse do consumidor por produtos saudáveis, com baixo teor de gordura e colesterol, justifica a intensidade de pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de novas tecnologias que reduzam apreciavelmente seus teores em alimentos processados.

Muitos processos tem sido desenvolvidos e implementados com o objetivo de reduzir o teor do colesterol em produtos lácteos, tais como: destilação por arraste à vapor, extração supercrítica, formação de complexos ou adsorção (empregando digitoninas, ciclodextrinas), conversão enzimática, entre outros (Spember, 1989).

A viabilidade da remoção do colesterol do óleo de manteiga utilizando Quilaia, um preparado comercial de saponinas obtido de cascas de *Quillaja saponaria Molina*, e terra diatomácea foi demonstrada por Sundfeld (1992).

O óleo de manteiga é um produto isento de água (<0,1%), resultante de uma seqüência de centrifugações do creme do leite, seguido de secagem à vácuo. É composto sobretudo por triglicerídeos, mas também contem ácidos graxos livres e contém de 2 a 3 mg/g de colesterol. Frações do óleo de manteiga recombinaas podem produzir um óleo de alto ponto de fusão, de potencial de aplicação em várias indústrias de alimentos, como por exemplo, indústrias de chocolates, substituído a manteiga de cacau.

O processo de remoção do colesterol do óleo da manteiga através do uso de quilaia é baseado no contato líquido-líquido da fase lipídica com uma solução aquosa concentrada de saponinas. O colesterol forma agregados com micelas de saponinas contidas na fase aquosa e sofre posterior adsorção em terras diatomáceas, podendo ser assim removido por adsorção/decantação/centrifugação. Esta tecnologia apresenta baixos custos operacionais, boa qualidade do produto final e elevado rendimento, sendo sua aplicação portanto favorável ao mercado brasileiro (Brunhara et al, 1996).

As saponinas compõem um grupo de produtos naturais que tem fascinado cientistas de todo mundo, pelo amplo espectro de efeitos biológicos que exercem, principalmente na formulação de vacinas em animais e seres humanos. Os estudos

relacionados à fabricação de vacinas com antígenos mais eficientes e a necessidade de se trabalhar com componentes de alta grau de pureza revolucionou os estudos de isolamento e purificação de Saponinas de Quilaia, conseguindo-se vencer os obstáculos da diversidade de sua estrutura (Kensil et al., 1991; Kensil et al., 1992, citado em Pillon et al., 1996; Behboudi et al., 1995). Os extratos de quilaia comercialmente disponíveis para fins alimentícios são extratos de cascas com variado grau de purificação denominados genericamente de Quilaia.

A propriedade de solubilização do colesterol, em micela de saponinas pode ser influenciada por componentes presentes no extrato de quilaia. A presença de impurezas nas micelas influenciam o fenômeno de formação destas, além de alterar o sabor e o aroma do produto final.

A técnica de fracionamento em coluna de bolha/espuma está baseada na habilidade de componentes de atividade de superfície, tais como as saponinas, se concentrarem na interface gás-líquido.

As bolhas de gás ascendem através da solução aquosa de saponina. As moléculas concentradas na interface gás-líquido são transportadas para a fase espuma que se formará quando as bolhas enriquecidas em substâncias tensoativas se desprendem da fase aquosa. O uso de colunas permite que a fase espuma se eleve axialmente, possibilitando a drenagem de líquido arrastado da solução inicial. Este refluxo interno é um segundo mecanismo que permite a adsorção das saponinas na interface das bolhas do leito de espuma.

Apesar do fracionamento por espuma ser uma técnica de fácil manipulação e de baixo custo, a literatura sobre o uso deste processo para concentrar e purificar saponinas é restrita. Acredita-se que essa limitação seja devido a dificuldade, também encontrada neste trabalho, para analisar e quantificar as saponinas de quilaia. Além disso, a estrutura molecular da saponina é complexa e num mesmo extrato podem existir vários isômeros de uma mesma espécie e associações destes com outros componentes.

Com o objetivo de se dar complementação ao Projeto integrado da FAPESP "Remoção do Colesterol do Óleo de Manteiga", visa-se através desta tese de mestrado, a possibilidade de recuperar e purificar a saponina de quilaia, usada no processo. Esse isolamento por técnicas convencionais e a purificação constitui um problema difícil de ser solucionado pela dificuldade de se separar os taninos, materiais corantes, açúcares, oxalatos, proteínas e outros compostos que são extraídos simultaneamente sendo o produto sensível ao calor, ocorrendo caramelização dos açúcares presentes no extrato e

formação de artefatos diferentes da saponina original.

Este trabalho contempla o uso da tecnologia de fracionamento por espuma para concentração e purificação de saponinas de quilaia do extrato comercial de quilaia (Sigma Chemical, USA), através da reprodução e adaptações de alguns artigos publicados.

Espera-se também ter contribuído com subsídios para a futura utilização da técnica de fracionamento por espuma aliada aos mecanismos de interação saponinas-colesterol, na recuperação de saponinas e colesterol das fases oleosa e aquosa provenientes do processo de extração do colesterol desenvolvido por Sundfeld (1992).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. TRITERPENOS

2.1.1. NOMENCLATURA

As investigações químicas com óleos essenciais no início do século XIX levaram ao isolamento de frações voláteis de hidrocarbonetos de fórmula $C_{10}H_{16}$ que foram denominados “*terpenos*”. Mais tarde isolaram-se compostos oxigenados que também se incluíam dentro desta classificação geral, geralmente álcoois, cetonas, ou outros constituintes menos voláteis com esqueletos de 15, 20 ou 30 átomos de carbono (Allinger, 1986).

Segundo Bittener et al. (1992), os terpenos geralmente são formados por unidades de 5 átomos de carbono e são provavelmente um dos compostos mais amplamente distribuídos na natureza, junto com os alcalóides e os compostos fenólicos.

Estes compostos são encontrados principalmente no reino vegetal, e são formados pela união virtual de unidades de C_5H_8 (Isopreno) e C_5H_{12} (Isopentano).

Essa relação do isopreno com os terpenóides é absolutamente formal. Pelo que se sabe do caminho da biosíntese destes compostos, os vegetais não o sintetizam a partir do isopreno, o qual nunca foi isolado como produto natural. No entanto, o conhecimento da união de duas ou mais unidades isoprênicas e do isopreno como um componente da estrutura, tem sido de grande ajuda na elucidação de sua estrutura. Isto levou a formulação da *regra do isopreno*, que foi enunciada por Ruzicka (citado em Bittener et al, 1992) que diz que um terpenoíde deve ser dividido em unidades de isopreno. A classificação dos terpenos depende do número de tais unidades de isoprenos (Newman, 1972), conforme indicado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Classificação dos terpenos com base em unidades isoprênicas Newman (1972)

Nome	Nº de unidades	Fórmula molecular
Monoterpenos	2	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpenos	3	$C_{15}H_{24}$
Diterpenos	4	$C_{20}H_{32}$
Sesterpenos	5	$C_{25}H_{40}$
Triterpenos	6	$C_{30}H_{48}$
Politerpenos	N	$(C_5H_8)_n$

Algumas exceções a esta regra, são aqueles compostos cujas estruturas não possuem um número de átomos de carbono múltiplo de cinco, como por exemplo, as iononas, que são incluídas dentro deste grupo por sua natureza isoprenóide. Por outro lado, se conhecem terpenóides que apesar de terem um número de átomos de carbono múltiplo de cinco, tem uma disposição que impede sua subdivisão nas mencionadas unidades isoprênicas.

Uma categoria importante dos triterpenos são os triterpenos pentacíclicos, que são compostos constituídos por um esqueleto base de 30 átomos de carbono originados do esqualeno e se encontram no estado livre, como estéres e/ou glicosídeos. Nos triterpenos pentacíclicos podem-se distinguir dois sistemas de anéis: esteroidal e tripernóide.

Todas as saponinas são glicosídeos de esteróis ou triterpenóides com atividade em interface (tensoativos). Saponinas triterpênicas predominam em plantas alimentares e um número muito grande de espécies químicas podem existir numa espécie (Prince et al., 1985).

2.2 SAPONINAS

2.2.1 GENERALIDADES

As saponinas (do latim sapon = sabão) representam um grupo de glicosídeos de esteróis ou triterpenóides, que se dissolvem em água e que apresentam atividade de interface, ou seja, que reduzem a tensão superficial da água. Estes compostos são anfífilos (hidrófobos e hidrofílicos). São formados por uma aglicona proveniente de anéis policíclicos chamada genericamente de *sapogenina* a qual pode ter um esqueleto esteroidal ou triterpenico, ligada a uma ou mais unidades de açúcares (Oakenful, 1981; Prince et al., 1987; Bittener et al., 1992).

As saponinas podem estar presente em qualquer parte da planta. Elas tem sido encontradas nas raízes, caule, frutas, folhas e em alguns casos na planta inteira. O conteúdo de saponina varia nas diferentes plantas, geralmente de 0,1 a 5%, mas na casca da quilaia ela chega atingir 10% e na raiz da gypsofila 20% (Prince et al., 1987).

Alguns dos vegetais que contribuem para a dieta alimentar contem saponinas. Entre os mais comuns cita-se: espinafre, beterraba, soja, alfafa, feijão, ervilha, aspargos, tomates, batatas e chá. As saponinas também aparecem em plantas de uso medicinal, cosméticos, ornamentais entre outros.

Os extratos de plantas contém misturas de saponinas variando muito em propriedades químicas, físicas e biológicas. As propriedades tais como poder emulsionante, capacidade de formação de espuma em soluções aquosas, efeito hemolítico no sangue e permeabilidade em membrana são atribuídas a alta tensão superficial das soluções aquosas. (Ruiz, 1979). Essas propriedades podem ser usadas na detecção e mesmo quantificação desses compostos.

A solubilidade destes compostos aumenta em soluções diluídas de alcóois (etílico, metílico e butílico), particularmente quando são aquecidos (Fernandes citado em Ruiz, 1979).

As saponinas são solúveis em água e etanol, parcialmente solúveis em metanol e insolúveis em acetona, hexano e hidrocarbonetos superiores. Podem ser parcialmente

precipitadas em soluções de hidróxido de bário, hidróxido de magnésio, acetato básico e neutro de chumbo, ou serem saturadas em soluções aquosas de sais como cloreto de sódio, sulfato de amônia e sulfato de magnésio (Ruiz, 1979).

2.2.2. O USO DE SAPONINAS

Devido à sua habilidade de formar espuma em solução aquosa mesmo à concentrações baixas como 0,01%, as saponinas tem sido largamente empregadas no preparo de bebidas, doces, xampus, sabões e extintores de incêndio (George, 1965).

Foram patenteados cosméticos que utilizam saponinas na formulação para produzir espumas que não agriçam o meio ambiente na concentração de 0,08- 10% em peso e pH 3,2 – 10,2 (Mizumaki e Kuroda, 1996).,

As saponinas são os triterpenos mais usados no controle da esquistossomose, pois são tóxicas aos caracóis. Na África os nativos preparam extratos de saponinas para controle da esquistossomose, tem se conhecimento de duas espécies de árvores africanas ricas em mais de 10% de saponina em peso (Rouhi, 1995).

Uma dieta rica em saponinas tem sido recomendada pelo número de atividades benéficas fornecidas ao corpo humano como por exemplo: efeito expectorante, antibiótico, anti-inflamatório, redução da concentração do colesterol no plasma e indução a formação de ácidos biliares. Kudou et al.(1993) relatam em seu artigo as atividades fisiológicas de saponinas de grãos de soja: antioxidante, inibidora da infecção do HIV e anticancerígena

Há muito tempo as saponinas são utilizadas como potencializador em vacinas como rábica, e antimalária. A atividade das saponinas como imunopotencializador não parenteral envolve vários mecanismos entre eles o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal (Mahraf, et al., 1986). Na última década, uma atração especial está sendo dada ao uso de saponinas de quilaia como componente da matriz de iscom (ver seção 2.3).

Algumas propriedades atribuídas as saponinas em geral como atividade hemolítica, formação de complexos com o colesterol e sabor amargo, são mais

propriamente características de tipos particulares de saponinas e nem sempre compartilhada com todas elas. Algumas propriedades já foram relacionadas a saponinas específicas e são comentadas abaixo.

Na Faculdade de farmácia da UFRGS estuda-se a saponina do *ilex paraguariensis* árvore originária do sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, onde é chamada mate; a qual é usada para preparo do chimarrão: o seu uso popularizou-se devido ao efeito estimulante, diurético e anti-reumático e que, em parte, pode ser atribuído às saponinas (Gosmann e Guillaume, 1995).

A Quinoa é um pseudocereal que é uma atração internacional como suplemento alimentar não somente pelo conteúdo proteico e qualidade dos seus aminoácidos mas também como fonte de vitaminas, minerais e gorduras. A quinoa apresenta uma média protéica de 14,6% (peso fresco) em algumas variedades equatorianas chega a um conteúdo protéico maior, que 21,9%. A proteína é de boa qualidade pela quantidade de aminoácidos disponíveis. A quinoa pode ser classificada como amarga ou doce de acordo com a quantidade de saponinas que apresenta. Na América do Sul a variedade predominante é a amarga (Koziol,1991).

A *Vernonia amygdalina* presente na África tropical (Oeste) é utilizada como antimalárico, anti-helmintico, antianeoerótico e para aplicações ginecológicas. Foi observado o comportamento dos chimpanzés doentes que tinham o hábito de mastigar esta planta (Igile et al.,1995).

A *Nauclea diderrichii* também da África é uma árvore sempre verde, usada contra parasitas e outras doenças tropicais (Lamidi et al., 1995)

O gênero *Smilax* possui 350 espécies largamente distribuídas nas zonas temperadas e tropicais através do mundo principalmente Ásia, América do Norte e América do Sul. No Brasil o primeiro estudo químico da espécie *Smilax* se deu no Rio de Janeiro (UFRJ- Faculdade de Farmácia) onde estudaram, isolaram e identificaram as saponinas desta planta utilizadas no tratamento da gota (Bernardo et al, 1996).

O estudo de saponinas de *Yucca schidigera* árvore nativa americana revelou grande potencial comercial. A planta tem permissão do FDA como segura para o consumo humano. O extrato de seus rizomas é utilizado como agente formador de espuma para bebidas carbonatadas e como acentuador do sabor. Seis saponinas foram

isolada da *Yucca schidigera*. Os compostos são ativos na proteção de produtos processados contra deterioração de alimentos por leveduras, como *Saccharomyce Cerevisiae*, *candida albicans* (levedura dermatologica) e *Hansenulla anomalla* (levedura responsável pela deterioração de alimentos) (Rouhi,1995).

Raízes de Ginseng (Ginseng Radix) são tradicionalmente usadas como tônico, sedativo, tranqüilizante e ativador antihemolítico. Sendo conhecido na medicina Chinesa como “*elixir da vida*”. Na farmacopeia japonesa a origem do Ginseng Radix é conhecida como *Panax ginseng* e dois tipos de Ginseng o branco, no branco a raiz é seca e descascada, e o vermelho, no vermelho as raízes são secas com vapor adquirindo uma coloração caramelada. Kitagawa et al. citado por Samukawa et al. (1995) descreve as transformações sofrida na biotividade devido ao processamento das raízes. Considerações recentes na bioatividade dos dois ginsengs e seus efeitos na corrente sangüínea e agregação das plaquetas promoveu um maior interesse para a caracterização quantitativamente e qualitativamente das saponinas de Ginseng (Samukawa et al, 1995).

2.2.3 CONSEQUÊNCIAS FISIOLÓGICAS E NUTRICIONAIS DO USO DE SAPONINAS EM ALIMENTOS

A ocorrência dos vários efeitos biológicos atribuídos às saponinas e as consequências fisiológicas e nutricionais de sua presença em alimentos e rações (efeito hipocolesterolêmico, toxicidade entre outros) são dependentes tanto da sua concentração quanto das estruturas químicas particulares presentes (Prince et al.,1987).

Em virtude de sua ação detergente e emulsificante as saponinas possuem atividade emolisante, sendo altamente tóxicos para peixes e animais anfíbios e produzem o temperanismo dos ruminantes (Ruiz, 1979)

A atividade hemolítica dos extratos de panama (*Quillaja saponaria Molina*) (Quilaia Bark), juazeiro (*Zizuphus joazeiro M.*) e raízes de salsaparrilha (*Smilax officinalis Kunth*) tiveram atividade hemolítica detectável a um nível de 10 ppm em refrigerantes vendidos no Brasil como extratos de liquores (Souza,1969).

O uso de plantas que contém saponinas como fonte de matéria prima para proteínas, fibras e amidos levou a uma vasta pesquisa sobre métodos de determinação e identificação das saponinas, para detectar se o gosto amargo no produto final processado era proveniente das saponinas ou de outros componentes (Curl et al. 1985; Fenwick et al.; Kitagawa et al., 1984).

Recentes estudos na Grã-Bretanha mostraram que a ervilha tem grande potencial como fonte de proteína vegetal para o consumo. No Reino Unido estudos tem sido realizados no intuito de aumentar a colheita, otimizar as condições de isolamento da proteína e identificar e explorar outros produtos provenientes do processamento.

Prince et al. (1985) analisaram a farinha de ervilha proveniente de 36 variedades de ervilhas e constataram a presença de taninos em todas as variedades mas não observaram relação entre a presença de taninos e os efeitos sensoriais indesejáveis. Comprovou-se então que as frações ricas em proteínas que foram isoladas continham saponina de soja I (soyasaponin I), a qual foi atribuído o gosto amargo e adstringente presente na farinha. Mas sendo o tanino uma família de diversos compostos polifenólicos a afirmação não exclui a correlação entre um composto fenólico específico e a sua influencia nos resultados encontrados.

A quinoa tem potencial pela suas propriedades de resistência a seca e ao frio e pode ser cultivada em solos pobres a altas altitude; sendo uma atração na Europa para ser utilizada na alimentação humana e ração animal. O problema para aceitação do produto é o gosto amargo que pode ser devido as saponinas as quais estão presente como proteção natural da planta contra insetos e pássaros (Ng, Price e Fenwick, 1994). Os autores encontraram a presença de ácido phytolaccagenic nas saponinas de quinoa. Este ácido não está presente em plantas usadas na alimentação humana e são conhecidos pela sua toxicidade para os animais. Todas as saponinas amargas continham este ácido e duas variedades de saponinas não amargas não o apresentaram (Ng et al., 1994).

A toxicidade das saponinas presente em ervilhas, feijão e soja foi analisada através da mortalidade de peixes e da atividade hemolítica. A atividade hemolítica dos extratos de feijão foram significativamente maior que a da ervilha e a da soja. A maior atividade hemolítica em células de sangue de carneiro e coelhos foram respectivamente

30,0 e 6,24 mg de saponina equivalente/ g de legume. Schimidt et al (1950) citado em Khalil e Adawy (1994) demonstraram que a atividade hemolítica das saponinas varia com a origem dos eritrocitos sendo inferior no homem e alto nos carneiros.

A forma de extração dos grãos também forneceram resultados diferentes de toxicidade. Quando a saponina era extraída com etanol / água (1:1) os extratos mostraram-se mais tóxicos aos peixes mostrando ser o melhor método para extração de saponinas. A toxicidade de saponina isoladas de diferentes legumes foi similar em ambos os ensaios (com peixes e sangue) exceto para as ervilhas que mostraram maior toxicidade em ensaios com peixes e menor toxicidade em ensaios com sangue, sugerindo que as saponinas presentes nos legumes tem comportamento diferente de acordo com a sua composição química (Khalil e Adawy,1994).

A alfafa (Lucerne) é barata e uma excelente fonte proteica apresentando um aumento no seu consumo como ração para o gado. Apesar de ser um legume rico esbarra num obstáculo, a presença da atividades fisiológicas das saponinas as quais são responsáveis pela inibição do crescimento de pintinhos e redução de ovos colocados pelas galinhas, além do inchaço em ruminantes. As saponinas de alfafa são glicosídeos formados por um triterpenoide pentacíclico como aglicona. A hidrólise ácida das saponinas de alfafa forneceu também sapogenóis de soja A-E e ácido medicagenico como produto principal e outros produtos em menores quantidades como o ácido lucernico e hederagenina. Os sapogenois de soja tem sido relatados como inofensivos aos pintos, ratos e camundogos enquanto o ácido medicagenico inibe o crescimento destes animais, sendo este o maior responsável pelos efeitos observados. Os autores extraíram este ácido da matéria prima original para aproveitamento do consumo da alfafa como ração.(Dinesh e Bories,1987).

Shany et al. (1970) citado em Khalil e Adawy (1994) relatam que os extratos da raiz da alfafa tem maior atividade superficial e são mais hemolíticos do que as partes mais altas da planta.

No Brasil investiga-se a *Ilex dumosa* Reissek a qual esta sendo usada para adulteração do mate (*Ilex paraguariensis*). As saponinas de *Ilex dumosa* possuem atividade hemolítica e recentes trabalhos associaram esta espécie a problemas gastrointestinais (Heinzmann e Schenkel, 1995).

2.2.4 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE SAPONINAS

- **Antecedentes**

Nos trabalhos de investigação das saponinas é preciso extrair cuidadosamente os componentes do vegetais em estudo para em seguida isolar e purificar os compostos presentes no extrato obtido. Os produtos obtidos da purificação são analisados com técnicas espectroscópicas descritas para triterpenoides e métodos químicos para sua identificação.

Para esclarecimento das estruturas de saponinas e ou sapogeninas, há técnicas que utilizam espectroscopia infravermelha, de ressonância magnética nuclear do carbono 13 (RMN¹³ C), ressonância magnética nuclear do próton (RMN¹H), espectros de UV/ Visível, espectros de massa e cromatografia líquida de alta eficiência. As técnicas espectrofotométricas podem sofrer a interferência de açúcares e outros interferentes na solução.

A cromatografia líquida de alta eficiência, tem sido utilizada para quantificação e identificação de saponinas. A medição do teor total de saponinas tem sido realizada com sucesso através da determinação das sapogeninas por HPLC ou cromatografia gasosa (CG). Os métodos envolvem hidrólise ácida das saponinas para formação das sapogeninas que são extraídas do hidrolisado com solventes orgânicos e purificadas por cromatografia em coluna. As saponinas purificadas são quantificadas diretamente por HPLC ou derivatizadas e analisadas por CG (Kaisuka e Takahashi, 1983; Grassi et al., 1996).

- **Cromatografia**

A Cromatografia é uma técnica que permite separar, isolar e identificar os componentes de uma mistura de compostos químicos. A amostra é distribuída entre duas fases, uma estacionária e outra móvel, de tal forma que cada um dos componentes da mistura é seletivamente retido pela fase estacionária.

A separação ocorre em uma coluna tubular recheada de um sólido poroso finamente dividido, na qual pode atuar como fase estacionária propriamente dita ou como suporte de uma fase estacionária líquida. Também se pode efetuar a análise utilizando como fase estacionária um papel de filtro ou um sólido finamente dividido, colocado em forma de camada fina sobre uma placa de vidro. Estes três tipos de cromatografia se baseiam nos mesmos princípios fundamentais, e se conhecem respectivamente como cromatografia em coluna (CC), em papel e de camada fina ou delgada (CCD) respectivamente (Benjamin et al., 1973).

- Cromatografia líquida

Durante muitos anos se praticou a cromatografia líquida de uma forma clássica e que consiste basicamente de uma coluna de vidro, cujo diâmetro varia entre 2 a 10 cm aproximadamente, recheada com algum material, como sílica, alumínio, açúcar e etc., cujas partículas são em geral de um tamanho de cerca de 200 μ .

Nesta coluna, se introduz a amostra dissolvida em fase móvel, por meio de um conta-gotas ou pipeta, e em seguida se coloca o solvente, eluindo-se a amostra através da coluna. O peso da amostra varia de 0,1 a 1,0 g ou mais. O solvente ou fase móvel flui através da coluna por efeito da gravidade, produzindo apenas uma, pequena pressão exercida pelo volume da fase móvel que se agrega à coluna. O soluto é recolhido na base da coluna em frações de volume determinado. Um dos inconvenientes desta técnica é o longo tempo de análise requerido, assim como, a impossibilidade de reutilização do recheio, pois uma parte da amostra se adsorve irreversivelmente. O principal problema da cromatografia líquida clássica é a identificação e quantificação dos componentes que eluem da amostra dissolvidos em fase móvel. Geralmente utiliza-se uma técnica auxiliar, como por exemplo, espectrofotometria, análise química, ou simplesmente registro gravimétrico, para calcular o conteúdo de cada um dos componentes da mistura nas frações coletadas (Benjamin e Harold, 1973).

- Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Este tipo de cromatografia utiliza colunas de diâmetro muito reduzido (2 mm), recheadas de materiais específicos pulverizados, cujas partículas tem um diâmetro de 30 – 40 μm , e em certas ocasiões, 10 μm . Esta coluna é muito eficaz na separação, mas oferecer grande resistência ao fluxo de fase móvel, dando uma grande queda de pressão. Por isso, se utiliza o sistema de bombas de alta pressão, que fazem fluir a fase móvel a uma velocidade razoável através da coluna. A quantidade de fase estacionária dentro da coluna é pequena, requerendo uma pequena quantidade de fase móvel.

Se a pressão na entrada da coluna não for muito elevada, a amostra é introduzida na câmara de injeção mediante uma seringa de alta pressão. Quando se necessita de pressões mais elevadas, utilizam-se válvulas de injeção.

Um detector é colocado na saída da coluna, proporcionando um registro contínuo da composição do líquido efluente, obtendo-se um cromatograma similar ao obtido por cromatografia gasosa (Benjamin e Harold, 1973).

- Cromatografia Gasosa (CG)

Os gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a Cromatografia Gasosa. A separação se baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A análise por CG requer substâncias estáveis termicamente, caso contrário há necessidade de se formar um derivado com estas características, o que nem sempre é viável (Collins, 1995).

2.2.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE SAPONINAS

A maioria das técnicas reportadas para extração de saponinas baseiam-se em extração com solventes orgânicos. Uma pré purificação do extrato é feita por meio de partição entre solventes. Estas técnicas se baseiam nas propriedades de solubilidade e polaridade, razão pela qual, se empregam solventes polares em diferentes proporções. A solubilidade destes compostos aumenta com a temperatura e portanto, a extração a quente sobre percolação contínua tipo Soxhlet, foi utilizada durante muito tempo (Ruiz, 1979). A extração com solventes encontrou bastantes inconvenientes, tais como a necessidade da manipulação precisa, excesso de tempo requerido para técnicas rotineiras, influência do solvente utilizado no sabor do produto final e a dificuldade de se isolar as saponinas dos taninos, cinzas, oxalatos e carboidratos que são extraídos simultaneamente com elas.

Como técnicas adicionais de extração e purificação, tem-se reportado a cristalização, a coleta de espuma, assim como as separações por cromatografia em coluna e por adsorção em carvão ativo. No caso de adsorção em carvão os resultados foram condicionados ao grau de purificação, marca e lote do carvão (Prince et al, 1985 e Van Atta et al., 1961). A produção de espuma está entre as propriedades mais comumente empregadas para detectar saponinas, mas o método está sujeito a consideráveis fontes de erro, tais como, a umidade relativa do meio, o tempo de passagem do ar para formar a espuma, o tempo da solução, assim como a interferência de outros compostos que produzem espuma (Ruiz, 1979).

Segundo Ruiz (1979) se tratando de saponinas um interesse todo especial é dirigido a análise e determinação da estrutura das sapogeninas. Sua liberação, entretanto, geralmente requer condições drásticas tais como a hidrólise ácida ou alcalina, com aquecimento por várias horas, podendo originar produtos de degradação das saponinas ou heterosídeos intermediários como pró-sapogeninas. Para obtenção de produtos genuínos da hidrólise, Ruiz sugere o uso de saponases, glicosidase, ou métodos microbiológicos.

Os efeitos de vários procedimentos de hidrólise no rendimento de sapogeninas e o perfil das saponinas obtidas foram estudados para a saponina de soja por Curl et al.

(1985), Fenwick e Oakenful (1981) citado por Ireland e Dziedzic (1985) e Prince et al. (1985).

Ireland et al. (1986) concluíram que a hidrólise com ácido sulfúrico em meio metanólico anidro fornecia melhores resultados do que a hidrólise com dioxano em água sugerido por Gestetner et al. (1966). O tempo de hidrólise com ácido sulfúrico foi de 3 horas e houve liberação dos sapogenóis de soja A e B. Os resultados comprovaram que os sapogenóis de soja B₁, C, D e E obtidos através da extração de saponinas de soja desengordurada, seguida de hidrólise e subsequente análise das sapogeninas por HPLC usando eluição gradiente e detector de massa por Ireland e Dziedzic (1985), são provavelmente artefatos do procedimento de hidrólise e que são possivelmente formados pela ação de ácidos aquosos sobre os sapogenóis A e B, fortemente influenciado, pelo tempo, tipo e composição do ácido usado na hidrólise.

Nos trabalhos de Ireland e Dziedzic (1985 e 1986) foi usada a razão sapogenina/carboidratos (1:1) para estimar o conteúdo de saponinas totais como o dobro do valor da sapogenina esta relação já havia sido usado nos trabalhos de Gestetner et al. (1966).

Para a determinação das espécies químicas individuais, assim como do teor total de saponinas, técnicas cromatográficas foram desenvolvidas, um grande número de trabalhos foram publicados e especial atenção foi dado ao CG. Mas o método, CG, só pode ser usado para separação e quantificação da aglicona (após hidrólise e derivatização) envolvendo perdas de informações estruturais sobre a parte glicosídica e perda de material durante a hidrólise e derivatização (Ruiz et al., 1995).

A técnica HPLC apresenta maior velocidade e poder de resolução à temperatura ambiente que a CG (Burnouf e Delfel, 1986) mas enfrentou muitas dificuldades relacionadas: ao comprimento de onda, a coluna cromatográfica, o tipo de operação HPLC e a escolha da melhor fase móvel que variavam muito para cada espécie de saponina e dentro desta espécie algumas saponinas eram preferencialmente eluídas em uma determinada condição cromatográfica utilizada.

Nos trabalhos publicados na década de 80 havia uma discordância entre os teores encontrados para saponinas por análise CCD (Cromatografia de Camada Delgada), HPLC (análise das saponinas inteiras e sapogeninas) e CG.

A diferença entre os altos valores encontrados por CCD por Fenwick e Oakenfull (1981) citado por Ireland e Dziedzic (1985) e os baixos valores encontrados Ireland e Dziedzic (1985) foram atribuídos a uma hidrólise incompleta das saponinas, havendo a necessidade da otimização do tempo de hidrólise e controle da perda de material durante a extração.

Foi também demonstrado que a análise de saponinas de lotes diferentes (mercadoria e procedência) por CCD não reportavam os valores obtidos por Ireland e Dziedzic, (1985) por HPLC ou Kitagawa et al. (1984) citado em Ireland e Dziedzic.(1985) por CG. A diferença dos valores encontrados para as saponinas foram relacionados a técnica utilizada e a procedência das saponinas. Possivelmente a análise por CCD fornecia valores maiores devido a formação de interferentes e a dificuldade de elimina-los.

Existe também uma controvérsia entre os valores encontrados pela análise sensorial para os produtos que contém saponinas e sua relação com a adstringência e o teor de saponinas presentes no produto (Prince et al; 1985; Ireland e Dziedzic, 1986)

Na década de 80 um dos poucos trabalhos de extração e purificação de saponinas por análise HPLC, fase reversa e leitura a 210 nm de saponinas, foi o de Shimizu et al (1983). As saikosaponinas purificadas eram comparadas com amostras autênticas através dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Foi observado que algumas saponinas são instáveis sob extração em condições ácidas não sendo identificadas no produto final, necessitando da adição de um tampão neutro na análise HPLC

A utilização do HPLC fase normal foi evitada para separar glicosídeos solúveis em água pois ocorre rápida deterioração da coluna de sílica gel pela fase móvel aquosa. Uma das soluções encontradas foi modificar o empacotamento da coluna, sugerida nos trabalhos Yamaguchi et al. (1986); e Kasai et al. (1987), que tornaram viável a separação

Radosevich e Delfel (1986) estudaram a influência da adição do TFA (ácido trifluoroacético) quando adicionado aos reagentes utilizados como fase móvel, no caso acetonitrila e água. A adição do TFA suprimiu a ionização do grupo carboxil por ser um ácido muito forte, aumentando a separação das saponinas por HPLC (fase reversa) para uma separação completa em oito saponinas triterpênicas. A adição do TFA deve ser

apropriada para HPLC preparativa porque o TFA é suficientemente volátil para ser removido por liofilização. A ordem de eluição das saponinas foi função da hidrofobicidade da porção triterpenica na molécula.

Devido a similaridade das estruturas químicas é extremamente difícil isolar as saponinas puras. Uma situação que apresentou bons resultados foi a apresentada por Kudou et al. (1993) para a soja. Eles relatam o isolamento de cinco saponinas de soja divididas em três grupos A, B e E em função da estrutura da aglicona (soyasapogenol A, B e E). Existe uma nomenclatura complexa para denominar as diferentes saponinas de soja conforme a ordem de eluição dos picos no HPLC, e, aparentemente, as mais importantes são soyasaponinas α g, β g, β a, γ g, γ a. O peso molecular destas saponinas variam na faixa de 892 a 1084. Na realidade, esses autores demonstraram que essas soyasaponinas são as formas intactas (estruturas conjugadas que seriam um DDMP), obtidas sob condições brandas de extração, de estruturas já conhecidas de saponinas de soja, ou seja, as soyasaponinas V, I, II, III e IV respectivamente obtidas com pré tratamento a 100°C. As soyasaponinas são apresentadas na Figura 2.1.

A solução de DDMP conjugado mudou para uma coloração marrom com aquecimento e produziu um componente identificado através de padrão analítico como maltol por HPLC e UV com máxima absorção em 274nm. A formação de maltol durante o aquecimento de saponinas pode ser um importante fenômeno no processamento de grãos (Kudou et al., 1993)

Kikuchi et al. (1987) determinaram monossacarídeos individuais isolados de saponinas comerciais japonesas através da análise HPLC, leitura com índice de refração de 546nm e padrão interno maltose. Os açúcares encontrados foram xilose, ramnose, glucose, e galactose. Kikuchi et al. (1987) relataram que a literatura apresenta trabalhos de hidrólise de glicosídeos sob condições drásticas, mas nestas condições os monossacarídeos sofrem decomposição. As condições de hidrólise e a escolha do solvente afetam a recuperação de monossacarídeos.

Ruiz et al (1995); Samukawa et al (1995) , Lamidl et al (1995) apresentaram trabalhos consistentes onde finalmente se chegou a um consenso que a técnica HPLC e brandas condições de extração forneciam as melhores condições para purificação de saponinas.

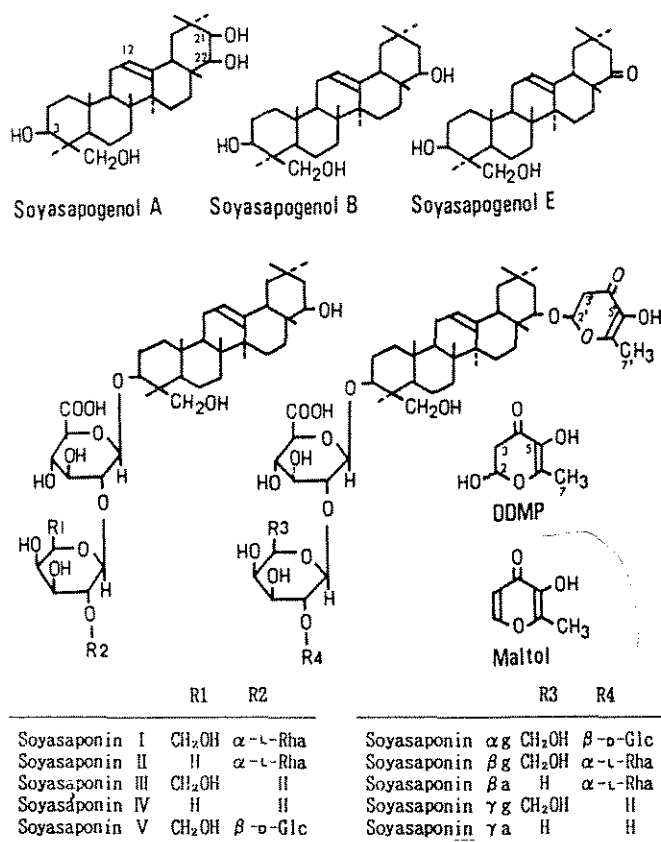


Figura 2.1 Estruturas do Grupo B de Saponinas em Sementes de Grãos de soja (Kudou et al, 1993)

Ruiz et al (1995) determinou por HPLC saponinas de tremço em condições suaves de extração com etanol e 0,01% de EDTA . A soyasaponin VI (SSVI) que é uma forma conjugado da soyasaponin I (SSI) foi a única saponina detectada em condições brandas. Concordando com o trabalho de Massiot et al (1992) que isolou a SSVI da alfafa e a caracterizou como precursor natural de SSI, Kudou postulou que os DDMP conjugados são forma intactas de saponinas, no caso do grão de soja enquanto as soyasaponins de I a V normalmente associadas a soja e que são obtidas após exaustiva extração à quente, são artefatos de degradação da forma DDMP.

Samukawa et al. (1995) estudaram a influência da variação da concentração do solvente, do diâmetro, do comprimento da coluna e da temperatura da coluna na separação por HPLC, em uma coluna C₁₈. Uma mistura de dois estereoisômeros. foi separada com o sistema gradiente e fase móvel ACN/Água (21:79 (v/v)) e ACN com

leitura a 202nm. As análises foram comparadas com os padrões obtidos por Kitagawa et al. (1983) citado em Samukawa et al. (1995)

As saponinas identificadas numa planta estão relacionadas com a espécie, a variedade, as condições de hidrólise da aglicona, a estabilidade de certas saponinas, a formação de artefatos e a técnica de ensilagem utilizada. Em uma mesma planta pode-se identificar saponinas diferentes de acordo com o tratamento utilizado e com a parte da planta utilizada (aérea, raiz, folhas, madeira ou casca) (Kalac et al.; 1996; Ng et al.; 1994; Rao e Bories, 1987). Os resultados de purificação obtidos também são fortemente influenciados pela técnica cromatográfica escolhida ou pela análise de saponinas inteiras ou de sapogeninas. Alguns trabalhos de extração e purificação de saponinas são apresentados na Tabela 2.2

Tabela 2.2 Identificações das estruturas de algumas saponinas

Espécie	Habitat	Condições de extração	Referências
<i>Venonia amygdalina</i>	Oeste da África	Extração com metanol, CC, CCD, HPLC, hidrólise, RMN	Igile (1995)
<i>Ilex Dumosa</i>	Brasil - Rio Grande do Sul	Extração com etanol, CC, hidrólise, CCD, RMN	Heinzmann e Schenkel (1995)
<i>Mimosa Prigii</i>	Porto Rico	Extração com metanol, extrato tratado com butanol/água; CCD, UV, CG, MS, RMN	Englest et al. (1995)
<i>Smilax Officinalis</i>	Rio de Janeiro – Brasil	Extração com metanol, partição entre água e butanol. CC com mistura de solventes e gradiente, hidrólise, RMN	Bernardo et al (1996)

2.3 SAPONINAS DE *QUILLAIA SAPONARIA MOLINA*

2.3.1 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

Comercialmente, Quilaia é uma denominação genérica para uma série de produtos obtidos das cascas de *Quillaja Saponaria Molina* conhecida também como sabão em casca (*soap bark*). É uma árvore nativa do Chile e do Peru, cultivada no Sul da Califórnia. A árvore tem de 15 a 20 m em altura e geralmente apresenta flores brancas. Uma ilustração da árvore se encontra na Figura 2.2. A espécie brasileira *Quillaia Selloniana* ou *Fontenellea brazilienses*, tem propriedades similares a *Quillaia Saponaria*. A árvore contém taninos e materiais corantes, sendo utilizada em fábricas para lavagens de roupas, limpeza de lentes, como detergentes, agente espumígeno em xampus e tônico capilar. A parte utilizada das cascas é a interna, seca e desidratada; a qual contém de 9 a 10% de saponinas. Os extratos da casca são também usados com agente emulsificante, em indústria de filmes, como expectorante, diurético e estimulantes cutâneos. O extrato líquido é empregado em loção para certos problemas de pele e do couro cabeludo (Grieve, 1998; Leung, 1980; Varsheney et al., 1985).

A literatura japonesa apresenta uma patente do uso de saponinas de quilaia para tratamento bioquímico de águas residuais de efluentes em tanques aerados (Tashiro, 1995).

A quilaia tem utilização comercial extensiva em alimentos, especialmente como agentes espumantes em refrigerantes, em mistura para coquetéis, sobremesas lácteas congeladas e em doces. Pelo aumento da permeabilidade da mucosa intestinal é também empregado em produtos farmacêuticos como vacinas, hipoglicêmico e potencializador da insulina. Sob o ponto de vista da legislação, a quilaia é permitida para o uso em alimentos na Inglaterra e classificada como *generally recognized as safe-Gras*, nos EUA (Sundfeld, 1998; Pillon et al., 1996 e Maharaj et al., 1986).

A fornecedora do extrato de quilaia, Sigma (1998), indica que as soluções de quilaia não são autoclaváveis; são estáveis apenas por 5 a 10 minutos a 100°C e são

estáveis no máximo por três dias, quando estocadas entre 0-4°C, recomendando o uso de soluções frescas.



Figura 2.2 Árvore de Quillaja Saponaria Molina (Rosaceuos)

As propriedades espumantes e emulsificantes das saponinas de quilaia são uma consequência direta de suas estruturas química. Elas são compostos anfifílicos, com uma aglicona hidrofóbica (sapogenina) determinada como sendo um triterpenóide que pode ser o ácido quilaico ou ácido gipsogênico. As partes hidrofílicas são duas cadeias complexas de carboidratos ligados aos carbonos C₃ a C₂₈ da sapogenina; estes açúcares foram identificados como ácido glicurônico, galactose, arabinose, xilose, fucose ramnose e apiose (Sundfeld, 1998; Prince et al., 1987).

As saponinas de quilaia associadas com lecitinas de soja são usadas na bioeliminação de fenantrenos e fluorantreno em sistemas aquosos solucionando um problema de impacto ambiental relacionado a bioeliminação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Os hidrocarbonetos seriam utilizados como substratos de várias

aumento da síntese a partir do colesterol no sangue e fígado (Oakenfull e Sidhu, 1983; Sidhu e Oankenful, 1986; Oakenfull e Sidhu, 1990).

2.3.2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE SAPONINAS DE QUILAIA

Rouhi (1995) relata o encontro dos cientista que se reuniram e discutiram em um Simpósio em Chicago as suas pesquisas com saponinas de quilaia, percebendo que apesar deles seguirem estudos parecidos chegaram a conclusões diferentes em relação aos compostos.

A literatura é um pouco escassa para saponinas de quilaia e os trabalhos de identificação são muito recentes, graça as pesquisas relacionadas ao uso da quilaia como potencializador de vacinas. Devido a quantidade e a pureza das saponinas de quilaia presente em vacinas influenciar a atividade imunológica e a toxicidade das vacinas estudos mais concretos começam a aparecer sobre purificação e identificação das saponinas de quilaia.

Varsheney et al.(1985) é a referência mais antiga sobre purificação de saponinas de quilaia que se tem conhecimento. Ele extraiu saponinas de quilaia tanto da casca como da madeira, com etanol em extrator tipo Soxhlet e posterior tratamento com solventes até produção de um produto bruto contendo saponinas tanto no tronco como na casca.

As sapogeninas foram separadas por hidrólise do extrato bruto e identificadas como ácido quiláico e gipsogênico por RMN, índice de refração e CCD. Varsheney et al.(1985) constataram que em meio básico não há desprendimento de açúcares. As saponinas brutas da casca foram purificadas com partição em butanol e por cromatografia em coluna de sílica, obtendo-se uma saponina pura que foi denominada Quilinin-A, com ponto de fusão de 284,5 °C. A hidrólise dessa saponina forneceu ácido quiláico e ácido glucorônico, galactose, glicose, arabinose, xilose, fucose e ramnose.

A reprodução deste artigo em uma pesquisa de iniciação científica no Laboratório de Engenharia de Processos, DTF (Araújo, 1997) não obteve os cristais de saponinas encontrados por Varsheney et al. (1985).

Em 1951 cientistas que conheciam a saponina de quilaia criaram um extrato chamado Quil A, usado em veterinária para vacinas e também usado em vacinas humanas. Mas o material era pouco conhecido quimicamente e produziu alguns efeitos tóxicos, dando origem a vários trabalhos que isolaram e caracterizaram os constituintes ativos do Quil A como adjuvante e potencializador de vacinas humanas (Rouhi, 1995).

A Quil A também foi obtida por Dolsgaard et al em 1974 (citado em Kensil et al. 1991) usando diálise, troca iônica e cromatografia por filtração em gel. Essa fração apresentava apenas uma banda no TLC (CCD), mas estudos posteriores (Kensil et al; 1991) usando HPLC em fase reversa, mostraram que o produto era uma mistura heterogênea de saponinas.

A dificuldade de se obter saponinas puras usando técnicas conhecidas na purificação de proteínas e a facilidade com que elas formam micela mistas sugerem o uso de solventes orgânico durante a fase de purificação para evitar miscelização (Kensil et al., 1991).

Usando uma laboriosa seqüência de purificações que culminou com cromatografia preparativa usando metanol como solvente, Kensil et al. (1991) obtiveram pelo menos 21 saponinas diferentes partindo da casca da quilaia. Eles denominaram essas saponinas de QS-1 a QS-21, sendo as saponinas QS-7, QS-17, QS-18 e QS-21 as mais importantes. Essas saponinas puras mostraram diferentes propriedades. Destas QS-18 é o mais abundante e o mais letal: doses de 25 µg provocaram morte em ratos.

O departamento de biotecnologia de Cambridge patentou a saponina purificada das casca da árvore de Quilaia, chamada estimulante QS-21, e o produto foi licenciado para cinco companhias e está sendo testado pela atividade como adjuvante em vacinas da malária, AIDS e melanoma (Cambridge Biotech., 1995).

A QS-21 oferece uma forte resposta imunológica quando injetada junto com o antígeno em camundongos, sendo utilizada como adjuvante em várias vacinas (Pillon et al, 1996).

Kensil et al (1991) também determinaram os monossacarídeos em cada QS, e concluíram que o peso molecular de quilaia variava de 1800 a 2200, significando que cada saponina tem de 8 a 10 resíduos de monossacarídeo. Estes autores usaram

cromatografia líquida de alta eficiência monitorando a absorbância a um comprimento de onda de 214nm para visualizar o pico da saponina de quilaia, concluindo ser esta faixa mais viável do que a dos demais artigos, que trabalharam a 205nm.

Higuchi et al.(1987) trataram as cascas de quilaia com metanol. Após extração o metanol foi evaporado à vácuo. O extrato seco sofreu partição entre acetato de etila e a água. A camada aquosa foi eluída em coluna com água e metanol. Os glicosídeos brutos provenientes do extrato obtido após evaporação foram eluídos através de uma coluna Sephadex e sofreram análise CCD. As saponinas de quilaia desaciladas obtidas após hidrólise alcalina em condições brandas tiveram suas estruturas elucidadas por RMN e foram genericamente classificadas como DS-1(hidrólise ácida da QS-21) e DS-2. (hidrólise alcalina da QS-18).

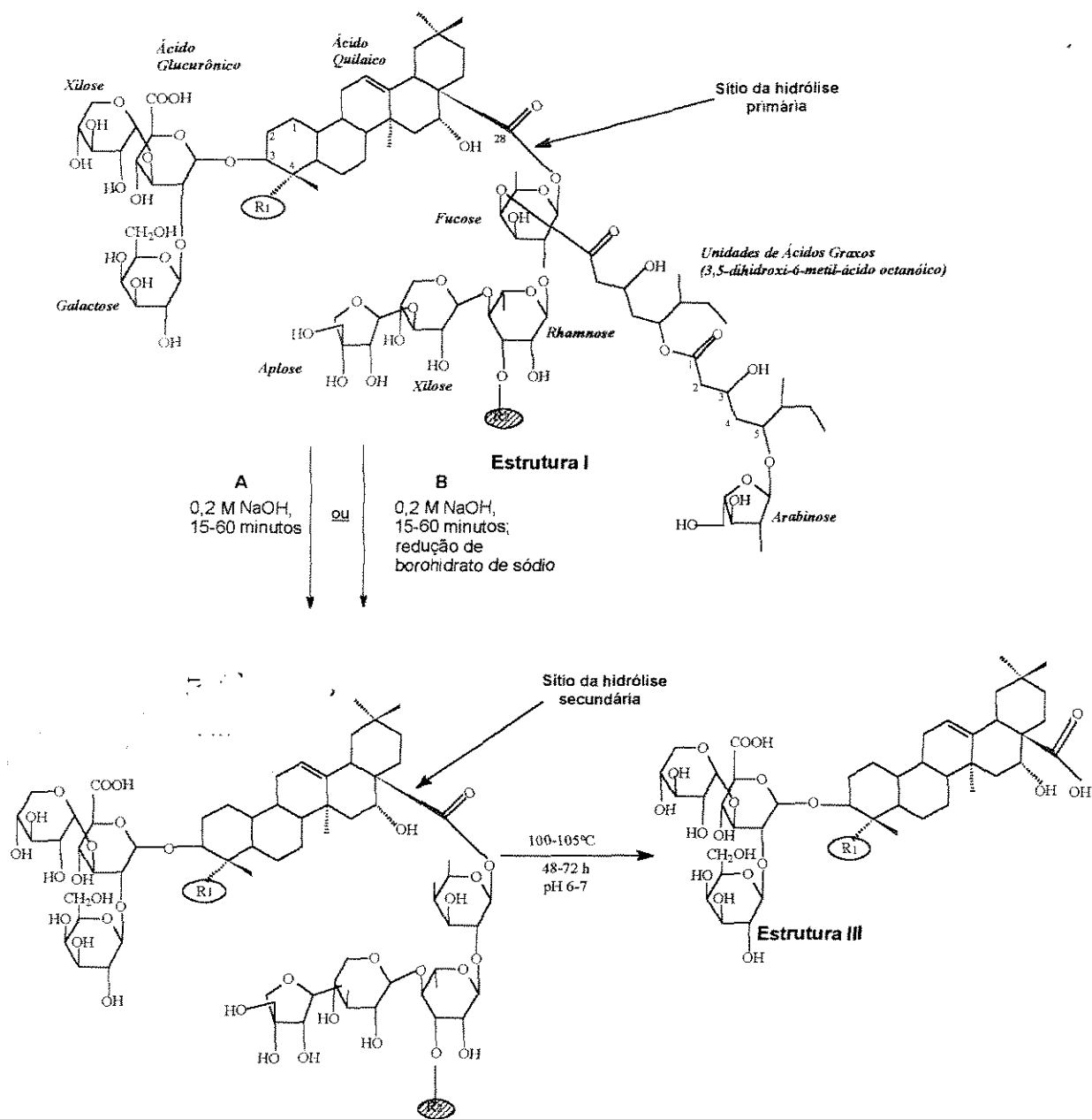
Pillon et al (1996) observaram que os derivados DS1 e DS2 não tem efeito imunológico quando injetadas com antígenos em vacinas, mas promovem a absorção nasal ou ocular de antibióticos. Em seu estudo Pillon et al. forneceram a mais elucidativa contribuição das estruturas possíveis da quilaia, QS, e seus derivados. Saponinas nativas QS-18 e QS-21 foram purificadas de um extrato aquoso de cascas de *Quilaja saponaria* por adsorção cromatográfica e HPLC fase reversa gradiente linear água/acetonitrila contendo 0,115% de TFA. As saponinas nativas foram desaciladas por hidrólise alcalina em meio básico em condições brandas fornecendo o DS-1 (a partir de QS-21) e DS-2 (a partir de QS-18) que já haviam sido identificadas por Higuchi et al.(1987).

Os derivados desacilados são menores e mais hidrofílicos do que as saponinas originais devido a remoção do ácido graxo e da arabinose da parte hidrofílica. O DS-1 sofreu tratamento para redução do resíduo aldeído formando o DS-1(R) ou para remoção da fucose formando o QH-957. Estas reações e a estrutura das saponinas nativas de quilaia (QS21 e QS-18) e as saponinas provenientes de transformações encontram-se na Figura 2.2. O DS-1 e DS-2 foram identificados por espectrometria de massa. A atividade surfatante relativa destes compostos também foi investigada por esses autores, conforme será relatado na Seção 2.

Na Suécia, nesta mesma época, também se investigava iscoms para vacinas e o trabalho de Behboudi et al (1995) é importante por ser o artigo mais recente sobre a determinação de saponinas de quília usando HPLC. Os iscoms foram feitos com duas

frações purificadas de saponinas (denominadas QHA e QHC) além de um extrato bruto de quilaia, conhecido comercialmente por *spikoside* e que foi usado como padrão interno. Usando uma coluna fase reversa C-18, uma vazão de solvente (acetonitrila: água 50:50) de 0,5 mL/min, os autores leram todos os conteúdos de saponinas em um só pico a 206 nm. A temperatura ambiente, o pico eluiu em 4 minutos.

Para separar por HPLC os dois componentes das saponinas QHA e QHC, usou-se um gradiente acetonitrila/água de 40 a 54% iniciado cerca de 3 minutos após a injeção. O pico da fração QHA elui a 4 minutos enquanto que o do QHC aos 8 minutos. As mesmas condições de operação foram usadas, mas o solvente foi tamponado a pH 5,5 com 10mM de acetato de amônio.



Estrutura II A/B

Estrutura		R1	R2	Mol
QS-21	I	CHO	H	1289
QS-18	II	CHO	GLICOSE	2151
DS-1	IIA	CHO	H	1513
DS-1(R)	IIB	CH ₂ OH	H	1515
DS-2	IIA	CHO	GLICOSE	1675
QH-957	III	CHO	-----	958

Figure 2 3 Estrutura de saponinas de *Quillaja* e derivados da saponina (Pillon et al, 1996)

2.4 SURFATANTES

2.4.1.GENERALIDADES

Os agentes surfatantes são também conhecidos como detergentes. São compostos químicos com uma natureza dual, a característica comum a todos os agentes de superfícies, anfífilos, porque nas moléculas existem dois grupos, com características de solubilidade diferentes: uma porção hidrofóbica (mais solúvel em solventes apolares) e a outra porção hidrofílica (mais solúvel em água). Em virtude dessa natureza dual dos detergentes, suas moléculas migram para a interface quando colocadas em solução, resultando numa diminuição da tensão superficial da solução em relação à do solvente puro. O alinhamento das moléculas de detergente na interface (porção hidrofóbica para o ar ou na fase apolar, e porção hidrofílica para a água) reflete a tendência da molécula de assumir a orientação termodinamicamente mais favorável (Attwood e Florence, 1983; Berthod, 1983).

A interface é a superfície que separa duas fases. A superfície e a interface são conceitos geométricos bidimensionais e aparentes. Aparentes, porque nas duas fases em contato não existe separação nítida e brusca, mas uma região onde ocorre a transição contínua das propriedades de uma fase às propriedades de outra. Portanto, entre duas fases existe uma região tridimensional intermediária, denominada interfase (entre fase). Cada uma dessas fases é caracterizada por um conjunto de propriedades. (Rabockai, 1979).

Detergentes também exibem auto-agregação. Quando em baixa concentração em solução aquosa, eles existem como monômeros dispersos. Acima de uma faixa de concentração característica (específica para cada tipo de surfatante) existe pouca ou nenhuma disponibilidade de espaço para moléculas na interface e com um aumento da concentração de surfatante, as novas moléculas de detergentes se agregam, formando estruturas denominadas micelas, como alternativa ao acúmulo na interface. O estreito intervalo de concentração no qual se inicia a formação de micelas é denominado de concentração micelar crítica (CMC) (Attwood e Florence, 1983).

Usualmente os detergentes são classificados com base na carga e/ ou natureza da sua porção hidrofílica (“cabeça”), geralmente representado por uma esfera, e na

flexibilidade e/ou natureza química da porção hidrofóbica (“cauda”) geralmente representado por um traço curvilíneo. (Berthod, 1983)).

Rabockai (1979) relata que quando a superfície de um líquido ou uma solução é aumentada subitamente, certa quantidade de líquido se move do interior da fase para a superfície. Este movimento corresponde a uma convecção, sendo a difusão molecular desprezível em virtude do curto lapso de tempo envolvido.

A composição inicial da superfície recém-formada é muito semelhante à composição da fase tridimensional. Esse estado não é de equilíbrio e a tensão superficial é denominada de tensão superficial dinâmica.

Logo após a criação da nova superfície, a convecção cessa e a difusão passa a ser o fator preponderante. Assim as moléculas de componentes adsorvíveis chegam a superfície por difusão. A tensão superficial decresce correspondentemente, adquirindo uma série de valores sucessivos denominados de tensão superficial dinâmica intermediária. Desse modo a tensão superficial decresce do valor dinâmico puro ao valor de equilíbrio denominado estático.

A dissolução do surfatante promove nitidamente um decréscimo na tensão superficial. De acordo com a isoterma de adsorção de Gibbs, este decréscimo é interpretado como consequência de uma adsorção positiva, ocorrendo um acúmulo de moléculas de surfatantes na superfície (Sparnaay, 1972).

Segundo Atwood e Florence (1983) a equação de Gibbs expressa o equilíbrio entre as moléculas de surfatantes na superfície ou interface com àquelas no seio da solução. A equação de Gibbs é particularmente usada para expressar a quantidade de surfatante adsorvido por unidade de área na superfície que é a *concentração superficial em excesso*, Γ . A concentração superficial em excesso representa a quantidade de moléculas que existe a mais do que aquela existente numa área equivalente no interior da solução (Lucena, 1995).

A equação de Gibbs é apropriada para a adsorção de solutos que não se dissociam tais como surfatantes não iônicos e para a adsorção interfacial limitada a faixas de concentração onde ocorre apenas a formação da monocamada.

Segundo Sparnaay (1972), a curva da tensão superficial (γ) vs logaritmo da concentração tem características comuns a todos os surfatantes solúveis e pode ser dividida em três partes apresentada na Figura 2.4 (a):

A baixos valores de concentração, o valor absoluto da inclinação aumenta com o aumento da concentração, aumentando a adsorção. A um certo valor de concentração, a inclinação torna-se constante, sendo esta a faixa de aplicação da equação de Gibbs, e a concentração superficial em excesso permanece constante

A terceira parte do gráfico tem uma inclinação zero e a adição de mais surfatante não afeta a tensão superficial. As moléculas adicionadas nesta fase não agem como moléculas individuais e sim como micelas. Ocorre saturação da monocamada molecular e a concentração superficial em excesso torna-se desprezível.

O comportamento de Γ com C Figura 2.4 (b) é portanto, válido até a saturação da monocamada (Lucena, 1995).

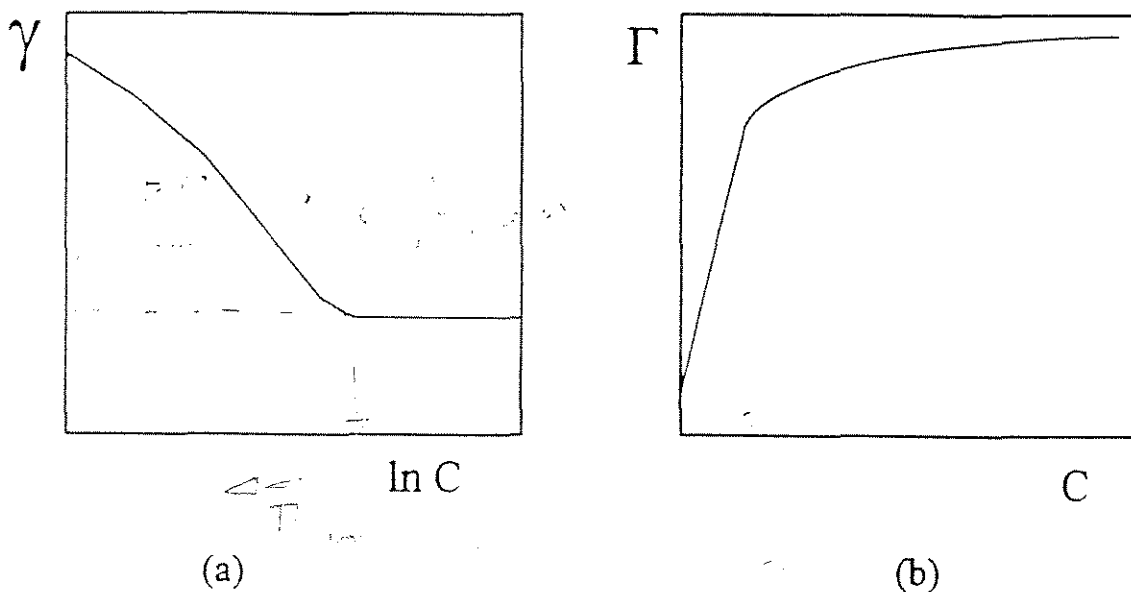


Figura 2.4: (a) Comportamento típico da tensão superficial com a concentração para soluções de moléculas com atividade superficial. (b) Comportamento de Γ com C (isoterma de adsorção) (Lucena, 1995)

Devido às propriedades anfifílicas das saponinas, elas formam agregados micelares e pressupõem-se que fatores que facilitem o processo de aproximação e agrupamento de surfatantes devem ser válidos também para as saponinas, embora não hajam estudos específicos sobre o assunto.

A atividade de superfície de um surfatante particular depende do balanço hidrofílico e hidrofóbico.

No caso de série homóloga de surfatante, um aumento no comprimento da cadeia hidrocarbônica resulta num aumento da atividade de superfície. Esta relação entre comprimento da cadeia hidrocarbônica e atividade superficial é expressa pela Regra de Traube (Atwood e Florence, 1983).

No caso de sais iônicos, geralmente ocorre aumento da tensão superficial da solução em relação a tensão superficial da água pura. Isto porque devido a forte interação íon-dipolo, existe a tendência das moléculas superficiais ingressarem no interior da solução. O trabalho para levar uma molécula do interior da solução a superfície é maior, uma vez que deve vencer as forças íon-dipolo, além das forças de Van der Waals (Rabockai, 1979)

2.4.2 MICELAS

Fridriksberg (1986) relata que o termo micela foi primeiramente denominado por Mc Bain em 1913. Atualmente a IUPAC (International Union of Pure And Applied Chemistry) define micelas como sendo agregados de dimensões coloidais existindo em equilíbrio com moléculas ou íons dos quais elas foram formadas (Myseles e Mujerjee, 1979).

Como as micelas usualmente não possuem uma atividade superficial, a CMC pode ser considerada como sendo a concentração no equilíbrio no qual o fenômeno superficial termina e começa a química coloidal.

Segundo Fridriksberg (1986) as micelas são caracterizadas pelo número de agregados (número de moléculas na micela) e a massa micelar (a soma das massas moleculares formada pelas moléculas que formam a micela).

O processo de miscelização é reversível, isto é, a diluição de uma solução para uma concentração menor que a CMC transforma a solução de um coloíde em uma solução verdadeira.

Quando se designa um dado número de agregação para um detergente, pode ocorrer um erro ao se imaginar agregados bem definidos e estáticos em solução. As micelas são estruturas dinâmicas, e a troca de monômeros entre as micelas e a fase aquosa ocorre constantemente (Wennerström e Lindman, 1979). O Número de Agregação é uma média da composição micelar num dado período de tempo e é

estimado pela divisão do peso molecular da micela pelo peso do monômero do detergente (Neugebauer, 1988).

A miscelização é um processo espontâneo com mudança do potencial de Gibbs. A remoção das cadeias hidrocarbônicas das moléculas difílica das micelas na água desórdena a estrutura da água e a entropia do sistema aumenta.

Interações hidrofóbicas são as forças responsáveis pela micelização. A parte hidrocarbônica de moléculas difílicas são forçadas para fora do meio aquosos para evitar o contato das cadeias com a água tanto quanto possível. Como resultado formam-se as micelas. O seu interior, o núcleo, é formado de um líquido hidrocarbônico (cadeias carbônicas combinadamente fechadas), enquanto sua parte externa de frente para a solução aquosa consiste de grupos polares, cabeças ionizadas ou não projetadas para fora da água. Um esquema da agregação micelar de surfactante aniônico é mostrada na Figura 2.5. Considerações mais detalhada da geometria das micelas indicam que as cadeias são aleatoriamente arranjadas e que elas não são totalmente protegidas pelas cabeças hidrofílicas dos surfatantes (Miller et al, 1985; Berthod, 1983).

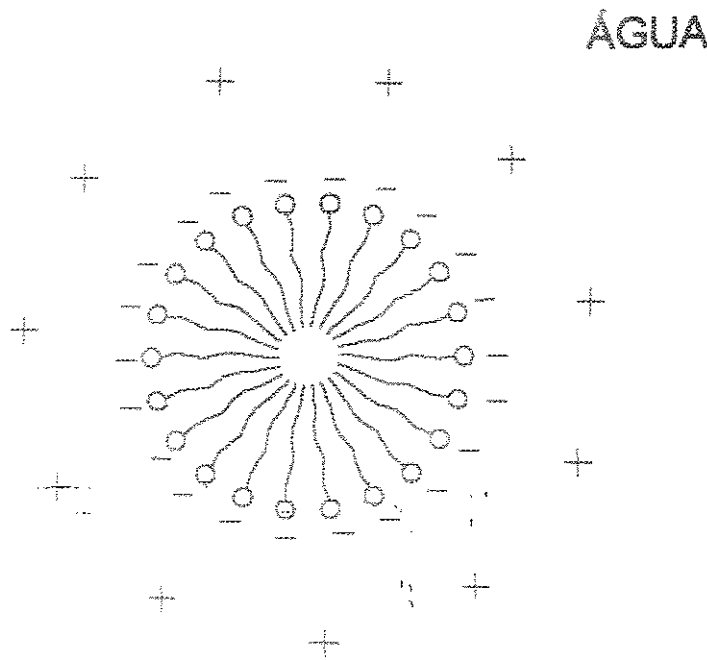


Figura 2.5 Esquema da agregação micelar de um surfactante aniônico (Miller e Neogi, 1985)

Imediatamente ao redor do núcleo está a Camada de Stern, a qual contém não somente as cabeças iônicas mas também $(1-\alpha)$ contra-íons, sendo o grau de Ionização, (α) , cerca de 0,2 a 0,5.

A Camada de Stern constitui a parte interna da dupla camada elétrica em torno da micela, existindo uma outra camada difusa, a qual contém um número permanente de contra-íons αn , chamada de Camada de Gouy-Chapman (Attwood e Florence, 1983).

Miller e Neogi (1985) concluíram que em surfatantes aniônicos, as micelas permanecem mais ou menos esféricas em concentrações na faixa acima da CMC, mas adquirem a forma cilíndrica, se a concentração de surfatante continuar a aumentar. Em concentrações de surfatantes aumenta de 20 a 30% em peso acima da CMC, provavelmente uma nova fase aparece, birefrigerante e altamente viscosa. Experimentos com difração de raio X demonstraram que nesta fase as micelas cilíndricas se arranjam na forma hexagonal. O interior da micela é aparentemente fluído, assemelhando-se a ligações hidrocarbônicas. Esta fase é um cristal líquido ordenado, não sendo um cristal verdadeiro, e é chamado *fase hexagonal*.

A concentrações maiores, o arranjo molecular de surfatantes em bicamadas torna-se favorável a outra fase líquida cristalina conhecida como *fase lamelar*. A estrutura das membranas biológicas são bicamadas moleculares fosfolipídicas e tem sido utilizadas para estudo do comportamento de membranas. Todas estas fase encontram-se esquematizadas na Figura 2.6 .

A transição de estruturas micelares acima da CMC não deve ser designado como uma segunda CMC para surfatante puro ou espécies agregadas (Mysels e Mukerjee, 1979).

A população das micela é freqüentemente polidispersa e o tipo de micela individual varia com a concentração. O interior de uma micela se assemelha a uma gota de óleo e a ressonância magnética mostra que as caudas hidrocarbônicas são móveis, mas relativamente mais lentas que as moléculas no seio da solução. (Atkins, 1990).

A CMC diminui com o aumento da parte hidrófoba do surfatante. É necessária uma energia térmica para a quebra do cristal e a formação das micelas. Kraft relatou que a solubilidade de um agente tensoativo iônico aumenta rapidamente a partir de uma temperatura determinada, denominada de Ponto de Kraft. Após o Ponto Kraft, o cristal é destruído, ocorrendo a dissociação do tensoativo em forma de micelas. O valor do ponto

Kraft está intimamente ligado a estrutura da molécula de tensoativo. Quanto maior o número de átomos de carbonos maior é o ponto Kraft e menor é a CMC. Em resumo, as micelas formam-se só acima da CMC e a temperatura mínima para formação de micela é o ponto Kraft (Miller e Neogi, 1985; Berthod, 1983).

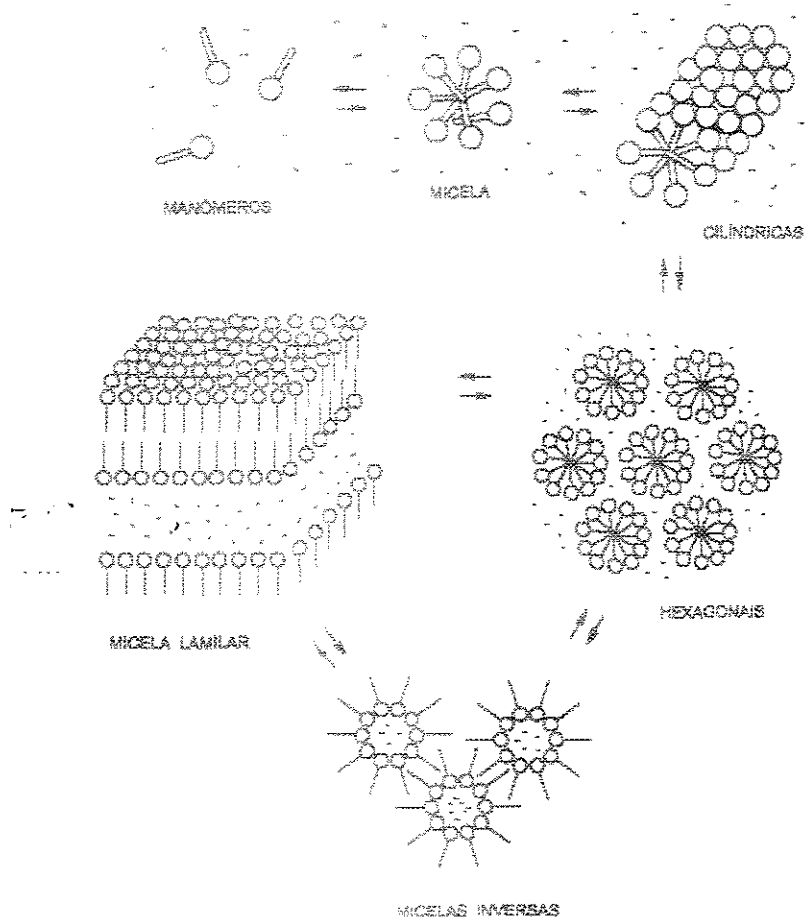


Figura 2.6 – Evolução da estrutura de um surfactante em uma solução aquosa com aumento da concentração de surfactante (Berthod, 1983).

Sundfeld (1998) estudou a mobilidade eletroforética e a polidispersidade das soluções aquosas de quilaia de dois fabricantes diferentes, Penco e Bell, através de medidas do Diâmetro de Stokes. Sundfeld concluiu que as quilaia Penco e Bell são produtos com características bastante distintas, apresentando diferenças na composição química. Suas soluções aquosas se comportaram diferentemente quanto a tensão superficial, condutividade elétrica e turbidez, e apresentaram partículas com características distintas quanto a dispersão (mono ou polidispersa), mobilidade eletroforética e tamanho.

Os sistemas micelares são utilizados como detergente. As micelas tem importância crescente em processos por sua habilidade em solubilizar substâncias pouco solúveis em água, que podem então ser transportadas em sistemas aquosos, dissolvidas no interior hidrocarbônico da micela. Nesse mesmo contexto, são também carregadores de drogas na indústria farmacêutica, e usadas para a recuperação de petróleo (Atkins, 1990).

Existem evidências que saponinas são hábeis em aumentar a absorção nasal, retal e intestinal de diferentes drogas. Um dos possíveis mecanismos é o aumento da solubilidade em água da droga e corresponde a formação de micelas de saponinas contendo os compostos solubilizados (Scöpke et al., 1995).

2.4.3 PROPRIEDADES DA CMC

A Concentração Micelar Crítica é o limite de concentração do detergente a partir do qual micelas são formadas. A CMC é um evento que ocorre abruptamente, em uma faixa muito estreita de concentração, e as moléculas de detergente adicionadas a uma solução que já se encontra na sua CMC serão incorporadas às micelas. Soluções acima da CMC serão compostos de micelas em equilíbrio com os monômeros (Ramos, 1991).

Experimentalmente, a CMC é determinada como o ponto de inflexão dos gráficos de alguma propriedade física da solução com função da concentração. Uma grande variedade de técnicas envolvendo medidas de propriedades físicas como tensão superficial, condutividade, pressão osmótica e *light scattering* (espalhamento de luz) tem sido utilizado para determinar a CMC (Attwood e Florence, 1983).

Os valores da CMC são muito dependentes da sensibilidade do método utilizado. As propriedades micelares obtidas por extrapolação da diluição infinita de micelas estão sujeitos a erros (Myusels e Mukerjee, 1979).

Quando medimos a CMC é comum medirmos a tensão superficial do solvente puro. O surfatante dissolvido no solvente é então adicionado e ocorre uma mudança na tensão superficial. Para cada concentração de surfatante é feita uma medida. Quando trabalhamos com surfatante puro, obtemos um gráfico semilogarítmico da tensão superficial vs concentração que fornece duas retas que se cruzam na CMC. Quando trabalhamos com surfatantes que contém uma invariável misturas de isômeros e

homólogos de vários pesos moleculares obtém-se um comportamento hiperbólico no gráfico de CMC (Anônimo, 1996).

Saponinas purificadas de *Quillaja saponaria* e *Saponaria officinalis* formam grandes agregados miceliares com ácidos biliares em soluções aquosas *in vitro*. Medidas de espalhamento de luz e depressão do ponto de congelamento indicaram que saponinas de *Quillaja* isoladamente formam grandes micelas em soluções aquosa, com aproximadamente 50 moléculas cada (peso miceliar 58.500), e que micelas mistas muito maiores são formadas com ácidos biliares (peso miceliar de 350.000). A microscopia eletrônica das micelas mistas de saponinas de quilaia com colato de sódio mostrou estruturas cilíndricas alongadas, com comprimento médio de 56nm. Uma estrutura proposta sugere o empilhamento das agliconas das saponinas entremeadas por dímeros de ácidos biliares (Oakenfull & Shidu, 1983; Oakenfull, 1986 citados por Sundfeld, 1998).

A CMC geralmente decresce com o aumento do Número de Agregação, com o aumento do comprimento da cadeia de surfatante e com o aumento de salinidade, já que estes efeitos contribuem para tornar o surfactante menos hidrofílico. A adição de propanol ou álcool de cadeias longas promove a formação de micelas e redução da CMC (Miller e Neogi, 1985).

A baixas temperaturas, a CMC decresce com o aumento da temperatura, devido a hidratação de monômeros. O aumento da temperatura causa uma repulsão na estrutura da água em volta dos grupos hidrofóbicos que se opõem a miscelização. Também tem sido observado um decréscimo no tamanho da micela de surfatantes iônicos com o aumento da temperatura (Atwood e Florence, 1983).

Sundfeld (1998) estudou a CMC de saponinas de quilaia, através da formação de micelas em meio aquoso, e verificou o efeito do pH, temperatura e adição de NaCl na CMC.

Os resultados indicaram um aumento da CMC com a temperatura e o pH e redução da CMC com adição de NaCl. Também foi constatado que o aumento da CMC com o pH é mais significativo quando se adiciona NaCl. Esses resultados concordaram com os das saponinas estudadas por Morita et al que também apresentavam ácido glucorônico na molécula (Sundfeld, 1998).

Na literatura sobre saponinas, segundo Schöpke et al. (1995), são encontradas investigações sobre a estrutura de micelas de saponinas (Schluman, 1967 e Park, 1986), sobre micelas de saponinas e ácidos biliares (Oakenful e Shidu 1986) e sobre valores de CMC de saponinas (Han 1984 e Kimata et al 1985). Não se encontram publicações sobre determinação da CMC da maioria das saponinas já conhecidas e a relação entre a estrutura específica dessas saponina e valores da CMC.

Schöpke et al. (1995) determinaram valores da CMC de um número variado de saponinas triterpênicas e misturas de saponinas. Foi constatado uma considerável diferença entre as curvas de tensão superficial vs concentração para saponinas puras e misturas de saponinas.

Alguns dos valores encontrados para a CMC são listados na Tabela 2.3. Os valores flutuam na faixa de 20mg/L a 400 mg/L, não se obtendo uma correlação com a estrutura química da saponina e a CMC. Encontrou-se uma relação entre a pureza da mistura de saponina e a CMC: a CMC do extrato de mistura de glicosídeos obtidos da *Sanicula europae* (10% de saponinas) é quatro vezes maior que a da mistura de saponinas de *Sanicula europae* (cerca de 100% de saponinas).

A CMC e a capacidade hemolítica de várias saponinas de quilaia foi determinado como medida relativa do poder surfatante por Pillon et al. (1996).

As saponinas nativas QS-18 e QS-21 formaram micelas a baixas concentrações (menor que 198,9 – 215,1 mg/L) e ocorreu hemólise dos eritrócitos dos carneiros em concentrações pequenas (50% de hemólise em 19,89-21,51mg/L); indicando que estas saponinas são surfatantes muito fortes. Os valores encontrados para CMC de DS-1, DS-2 e QH-957 foram similar e estão representados na Figura 2.7

A capacidade hemolítica de DS-1 e DS-2 foram similar e QH-957 apresentou fraca capacidade para hidrolisar os eritrócitos. A quantidade disponível de DS-1R não foi suficiente para determinar a CMC, entretanto o potencial hemolítico determinado fornece valores intermediários entre DS-1, DS-2, e QH- 957. Com estes dados a ordem decrescente de poder surfatante encontrada foi: QS-21; QS-18 > DS-1, DS-2 > DS-1 (R) > QH-957 (estas estruturas encontram-se na Figura 2.3)

Tabela 2.3 Concentração micelar crítica (CMC) de saponinas
(Schöpke et al., 1995)

Saponina	CMC (mg/L)	Saponina	CMC (mg/L)
<i>Hedera helix</i> (mistura de saponinas)	300	Bellissaponin BS1	100
<i>Sanicula europae</i> , extrato de mistura de glicosídeos	400	Bellissaponin BS2	20
<i>Sanicula europae</i> , mistura de saponina	40	<i>Bellis perennis</i> , mistura de saponinas	100
Acido cholic	200	Scberoside A ₂	400
Foetidissimoside A metil ester	6,5	Scberoside B ₅	200

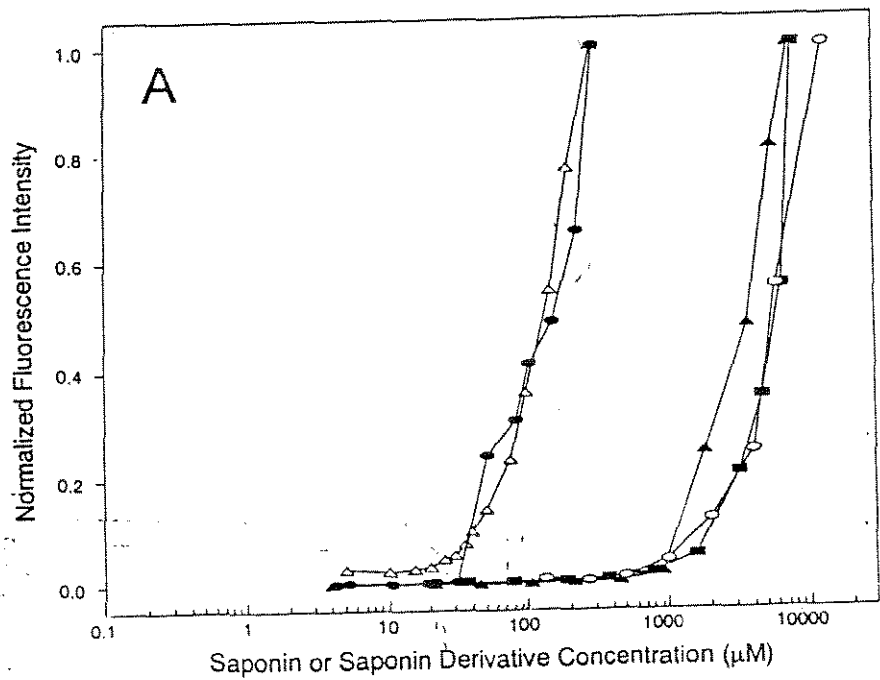


Figura 2.7 Propriedades surfatantes de saponinas nativas e derivados de saponinas. A intensidade de fluorescência foi medida a 490 nm como função da concentração da saponina e de seus derivados. • QS21, ▲ DS-2, ■ QH-957, DS-1 ○, △ QS18 (Pillon et al.,1996)

2.4.4 INTERAÇÕES DE TENSOATIVOS COM MACROMOLÉCULAS

Pouco se sabe das interações químicas entre saponinas e proteínas ou do efeito da adição de saponinas presentes nos alimentos a diferentes proteínas na colesterolemia, e mais estudos deveriam ser feitos com sistemas modelos.

Saponinas de quilaia tem sido adicionadas à caseína e a proteína isolada de soja (SPI) e as interações saponinas-proteínas investigadas por eletroforese em gel e fluoroscopia. O impacto no metabolismo do colesterol também foi investigado. Os resultados das interações estudadas mostraram que complexos de alto peso molecular são formados gradualmente entre saponinas e caseínas, enquanto a SPI formam agregados insolúveis com o aquecimento, independente da presença de saponinas. As saponinas de quilaia reagem diferentemente com caseínas e SPI (Potter et al., 1993).

Surfactantes não iônico e proteínas não apresentam interações ou elas são extremamente fracas e estão normalmente dentro dos seus limites de sensibilidade dos métodos analíticos usados. Observou-se fraca interação hidrofóbica entre as seções hidrofóbicas das proteínas. A conformação das proteínas permanece praticamente a mesma, indicando que surfactantes não-íonicos não devem dissolver proteínas pouco solúveis, desnaturar proteínas, ou contribuir para um entumescimento de epidermes (Schwunger e Bartnik, 1980).

Estudos de Schwunger e Bartnik (1980) com polímeros e surfactantes tem mostrado que variadas e intensas interações podem ocorrer com os polímeros, particularmente quando o surfatante é aniônico, que promovem um aumento significativo na solubilidade devido à formação do complexo proteína/surfatante.

O surfatante não iônico não pode alterar a solubilidade de proteínas insolúveis com função da adição de concentração do surfatante enquanto que o surfatante aniônico causa um aumento significativo na solubilidade devido à formação do complexo proteína/surfatante.

Dependendo do grau de saturação do surfatante e da proteína, poderá haver mudança na conformação da molécula de proteína. O complexo surfatante/proteína deve ser interpretado como um composto com novas propriedades, diferentes, dos constituintes originais, surfatante e proteínas.

Os complexos de proteínas/surfactantes são caracterizados por considerável atividade interfacial distintamente mais pronunciada que a atividade de surfactantes

puros nas regiões de baixas concentrações. A Figura 2.8 apresenta o decréscimo constante na tensão superficial no caso de soluções de surfatante puro (antes de alcançar um patamar da CMC). Quando macromoléculas estão presentes, o decréscimo inclui um *plateau*.

A presença de eletrólito comuns também afeta a interação entre surfatante aniônico e polímeros. Os ânions de eletrólitos como por exemplo Cl^- ou $\text{SO}_4^{=}$, protegem as posições das macromoléculas onde podem ocorrer interações eletrostáticas com os grupos hidrofílicos de surfatante aniônicos reduzindo consideravelmente, as interações. A Figura 2.9 ilustra este fenômeno para o sistema gelatina/ dodecil sulfonato de sódio/ cloreto de sódio, apresentando uma redução acentuada, com tendência a um *plateau*, a baixas concentrações

Morein et al. (1984) citado por Sundfeld (1998) relataram que saponinas de *Quillaja* se associam a glicoproteínas para formar micelas a uma concentração igual ou maior que 0,03%.

As saponinas podem interagir com proteínas presentes nos alimentos. As interações de saponinas presentes na *Quillaja saponaria*, chá e soja com sais de proteínas solúveis foram estudadas por Tanaka et al.(1995). As interações saponinas/proteínas foram medidas pela turbidez a 660nm. As saponinas de *Quillaja saponaria* aceleraram a agregação de proteínas de sais solúveis e o efeito aumentou com o aumento da concentração da saponina na mistura.

Saponinas de *Saponaria officinalis* e saponinas de soja formam micelas em soluções aquosas, tanto isoladamente como com ácidos biliares, mas as características das micelas formadas são diferentes para cada saponina. A formação destas micelas mistas no intestino delgado foi sugerido como o mecanismo de base molecular para os efeitos de saponinas no metabolismo dos ácidos biliares e colesterol biliares (Oakenfull & Shidu, 1983; Oakenfull, 1986) citados por Sundfeld (1998).

O processo da solubilização é espontâneo, reversível e controlado pelo ajuste de temperatura e concentração de surfatante.

Van Atta et al.(1961) usaram o colesterol para recuperar saponinas de alfafa. Uma mistura de colesterol, alfafa e terra diatomácea foi lavada com água e o extrato dissolvido em éter etílico, filtrado e lavado. As saponinas que interagiram com o colesterol variaram conforme a procedência da farinha da alfafa .

Schwartz et al. (1967) desenvolveram um procedimento quantitativo para remoção de colesterol do óleo de manteiga, baseado na passagem do óleo de manteiga solubilizado em hexano, por uma coluna de Celite 545 impregnada com uma solução aquosa de digitonina.

Micich et al. (1992) relataram que as saponinas digitonina e tomatina complexaram com colesterol a partir de soluções de colesterol e de óleo de manteiga em vários solventes. A complexação do colesterol é dependente do tipo de solvente e foi mais completa com hexano.

Sundfeld (1992) propôs um processo de extração do colesterol envolvendo uma partição do colesterol de uma fase oleosa com uma dispersão coloidal de saponinas. O mecanismo envolvia a solubilização do colesterol nas micelas de saponinas de quilaia presentes em solução aquosa, seguida da adsorção da fase rica em colesterol em terra diatomácea.

O processo para remoção do colesterol do óleo da manteiga por micelas mistas de saponinas desenvolvido por Sundfeld (1992) foi otimizado por Brunhara et al. (1996) quanto as variáveis operacionais tais como: a concentração de quilaia (surfatante aniônico), temperatura e tempo de agitação do processo de extração e a quantidade de terra diatomácea.

2.5 FRACIONAMENTO POR ESPUMA

2.5.1 ESPUMAS

A espuma consiste em um grande número de pequenas bolhas dispersas em uma fase líquida contínua. Uma película fina de líquido separa as bolhas entre si (Rabockai, 1979). Espumas são um tipo particular de emulsão cuja estabilidade, depende principalmente, da maior ou menor resistência à perda do solvente do filme líquido que envolve o gás. A perda (drenagem) produz uma progressiva diminuição do solvente de modo uniforme em toda a parede, ou apenas em algum ponto da mesma. Em ambos os caso há diminuição da resistência à pressão e choques podem destruir a espuma (Bobbio e Bobbio, 1992).

A formação de espuma é combinada com um aumento de superfície e é possível somente quando a tensão superficial dos componentes da espuma são pequenos. Em sistemas de espumas, o equilíbrio é dinâmico e não estático. Um aumento na superfície para formação da espuma age contra a estabilidade, com um decréscimo na tensão superficial. Um bom agente espumante apresenta baixa tensão superficial combinada com baixa pressão de vapor (Berkman e Egloff, 1934).

O rompimento do filme entre duas bolhas adjacentes leva a formação de uma bolha maior com um diâmetro maior, fenômeno chamado de coalescência. A coalescência leva a maior dispersão de diâmetros e bolhas na coluna de espuma (Lemlich, 1978; Narsimham e Ruckenstein, 1986 b, Sarma e Khilai, 1988 e Bisperink et al, 1992; citados em Rosa, 1996).

A formação de bolhas maiores pode conduzir a um empacotamento que se rearranja subitamente, com a possibilidade, conseqüente de choques mecânicos serem suficientes para romper as películas extremamente finas de uma espuma bem drenada (Miguel, 1987).

Diferenças qualitativas entre as características espumantes de diversos líquidos, levam a obtenção de espumas diferenciadas quanto ao seu comportamento físico. Algumas espumas são úmidas (apresentam baixa razão de gás/ líquido) e provavelmente sujeitas a uma drenagem rápida, a menos que a viscosidade do líquido seja muito alta, e

haja uma grande mobilidade interna. O alto conteúdo de líquido minimiza o contato entre as bolhas e o conseqüente empacotamento e permite o deslizamento entre elas. Em um caso extremo quando o volume de líquido torna-se consideravelmente maior do que o de gás, as espumas são diluídas e as bolhas assumem uma forma esférica, separadas entre si por películas espessas de um líquido relativamente viscoso, com débeis interações mútuas. Estes sistemas são conhecidos por emulsões gasosas. Na espuma verdadeira, as bolhas são compactas (aglomeradas) apresentando formas poliédricas, separados por películas finas de um líquido de viscosidade baixa. Uma espuma úmida que seja suficientemente estável drenará até se transformar em uma espuma seca, com baixo conteúdo de líquido, com as bolhas adquirindo a forma poliédrica. (Birkermam, 1965; Rabockai 1979; Miguel 1987).

As espumas apresentam estruturas definidas. Três filmes se juntam formando ângulos de 120° grau cada, devido a união das três bolhas adjacentes, adquirindo a configuração apresentada na Figura 2.10, onde A, B e C são as bolhas continuas e 1, 2, e 3 são os filmes que as separam. O triângulo formado é denominado Borda de Plateau. A partição entre essas bolhas são planas. Nessas condições as tensões superficiais que atuam ao longo dos septos possuem resultante nula. No ponto b, as superfícies são côncavas e portanto a pressão no líquido neste ponto é menor que na superfície plana, existindo um gradiente de pressão no líquido. Este gradiente de pressão causa um tipo de sucção que é uma grande contribuição para a drenagem da espuma (Bikerman, 1965; Rabockai 1979; Rubin e Garden, 1962).

As espumas podem ser produzidas por condensação ou por dispersão. No primeiro caso, a fase gasosa encontra-se inicialmente presente em moléculas separadas as quais quando se unem e formam as bolhas. Um exemplo é a espuma de cerveja onde o CO_2 produzido está dissolvido no meio aquoso; quando a pressão no líquido é reduzida a solução torna-se supersaturada e o excesso de soluto forma uma fase gasosa dispersa. Este processo originou a técnica conhecida como DAF (Dissolved Air Flotation) cuja característica é a geração de microbolhas. No método de produção por dispersão, o gás contido num sistema é disperso através da fase líquida ou por agitação mecânica ou por borbulhamento através de pequenos orifícios como capilares e placas porosas. (Bikerman, 1965, Lucena 1995).

Segundo Bikerman (1965), as espumas estão sujeitas a três processos: redistribuição do tamanho das bolhas, afinamento do filme e ruptura do filme.

A redistribuição do tamanho é causado pela dependência da pressão do gás na bolha sobre a curvatura nas paredes. O gás se difunde das bolhas menores para as bolhas maiores pois não existe impermeabilidade à difusão do gás na parede da região de alta pressão para a região de baixa pressão

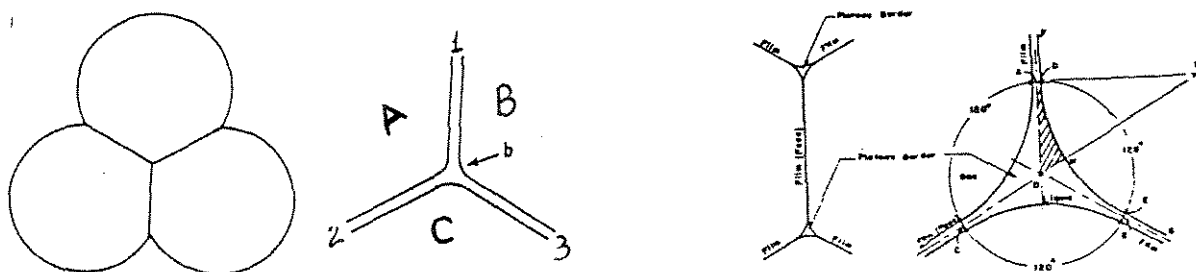


Figura 2.10 União de três bolhas adjacentes formando Bordas de Plateau (Rubin e Garden, 1962; Bikerman, 1965; Leonard e Lemlich, 1965)

2.5.2 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DO FRACIONAMENTO EM COLUNA DE BOLHAS E ESPUMAS

Os métodos de separação por adsorção em bolhas baseiam-se na tendência de componentes de atividade de superfície adsorverem na interface gás-líquido, entre bolhas de gás e a solução líquida presente. O fenômeno básico que ocorre na região da interface é apresentado na Figura 2.11. As bolhas de gás percorrem a solução líquida inicial que contém os solutos de interesse. As moléculas do soluto difundem e são concentrados na interface gás-líquido. Os solutos adsorvidos são transportados pela fase espuma que se formará quando as bolhas saem da fase aquosa. (Santana, 1995). Essa adsorção superficial é o princípio básico da separação por espuma. A espuma é então coletada e condensada produzindo um líquido mais rico neste soluto que a solução residual (Rubin e Garden, 1962).

O estudo de compostos com atividade de superfície em colunas de espuma tem sido feito por inúmeros pesquisadores em todo o mundo e diversos trabalhos sobre o tema tem sido publicados mostrando a viabilidade do processo para a concentração, separação e recuperação de compostos a partir de soluções muito diluídas. O

fracionamento por espumas é feito em colunas operando em batelada ou contínua e suas variações, foram descritas por Lemlich (1968) assim como as características e os princípios básicos de cada modo de operação.

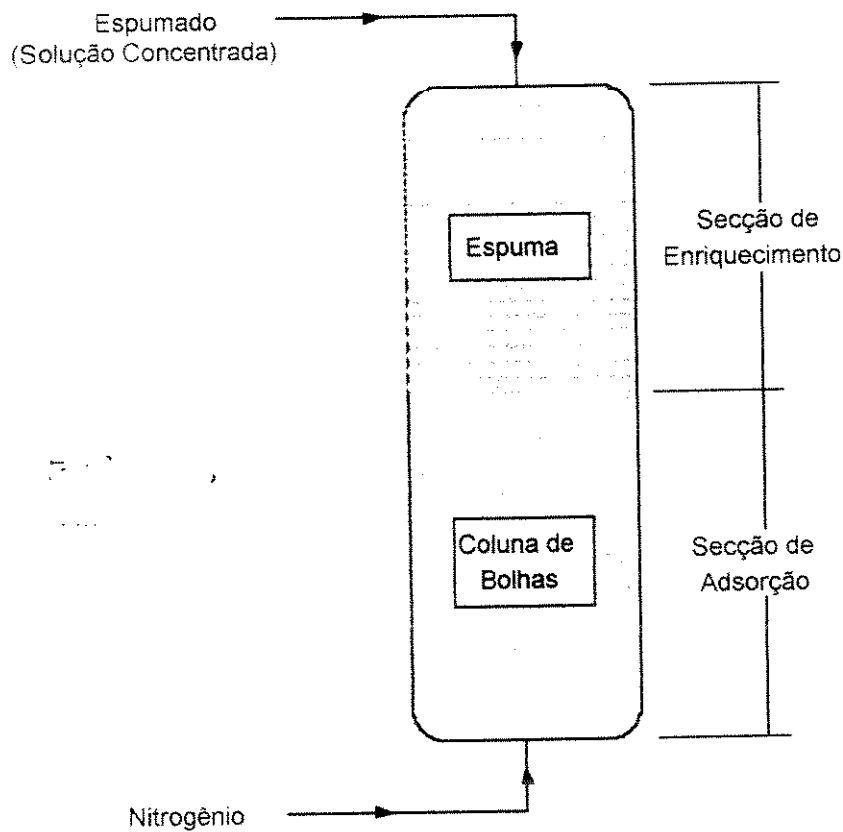


Figura 2.11 Esquema básico de uma coluna de bolhas e espuma (Santana, 1995)

Historicamente o fracionamento por espuma em laboratório iniciou-se por volta de 1900 e a espuma usada para remover oleato de sódio de soluções aquosas, para comprovação da Equação de Gibbs (Lemlich, 1968).

Com o número crescente de trabalhos sobre separação por adsorção em bolhas, a terminologia usada tornou-se confusa e surgiram contradições. Para clarificar a situação propôs-se a nomenclatura apresentada na Figura 2.12. (Lemlich, 1968).

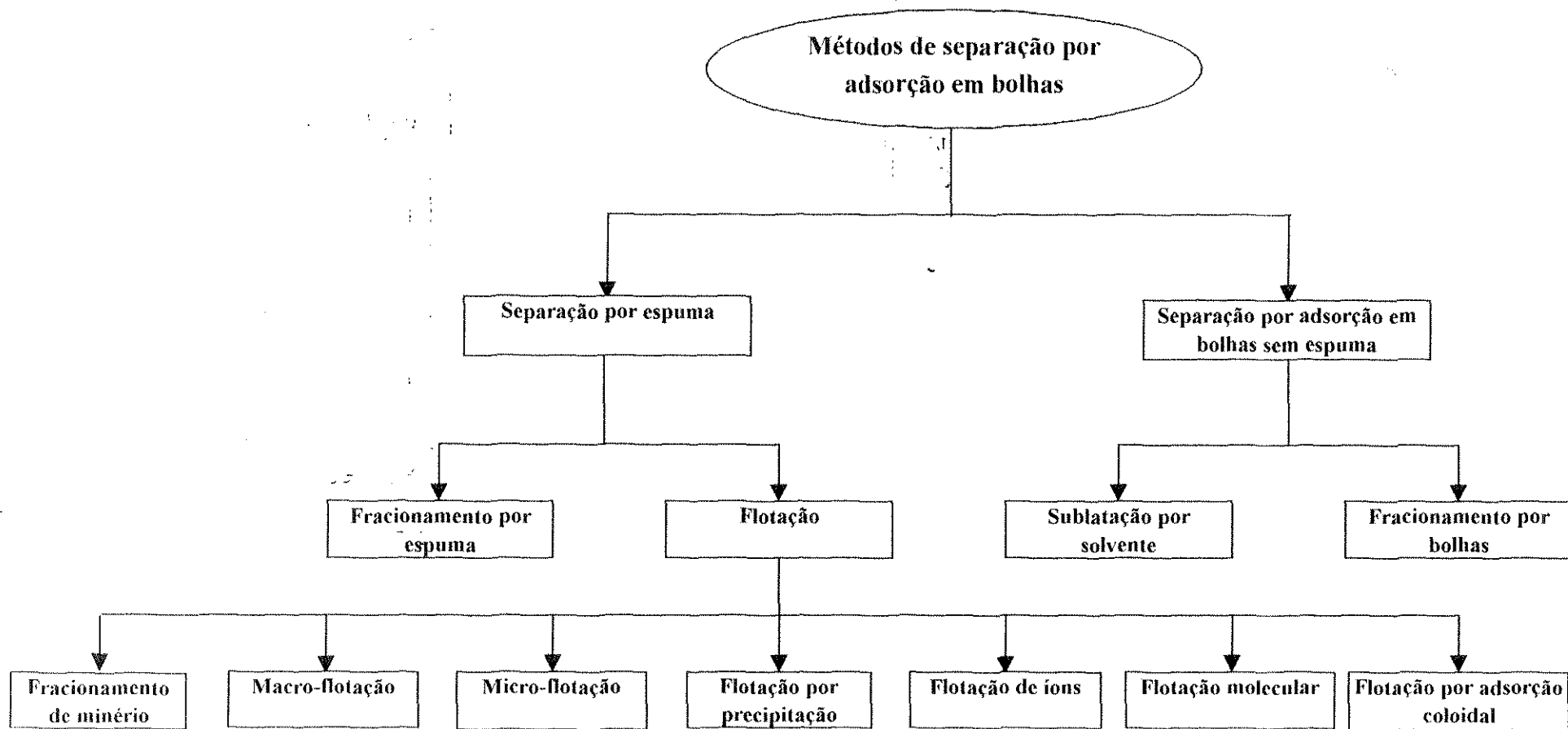


Figura 2.12 Classificação dos processos de separação pela adsorção em bolhas (Lemlich, 1968)

Em linhas gerais, se no processo está envolvido a espuma, então o termo aplicado é Separação por Espuma. Quando não há espuma envolvida o processo é denominado Adsorção em bolhas.

Segundo Rubin e Garden (1962) o sistema de separação por espuma pode ser operado tipo batelada, contínuo ou multi-estágio e contracorrente. O termo batelada é inadequado porque nesse sistema o gás é mantido e o espumado continuamente removido da solução original, até o esgotamento em tensoativos. Tanto sistemas que produzem espumas estáveis como instáveis podem ser tratados por batelada, e geralmente estas unidades são utilizadas para purificação de soluções ou remoção de material. Se o volume da mistura líquida é relativamente maior que o volume de espuma coletado (espumado) o processo batelada deve ser usado. No sistema contínuo a solução de alimentação é continuamente adicionada à coluna enquanto o espumado e o resíduo são continuamente removidos. No sistema multi-estágio e contracorrente a operação é conduzida por uma série de estágios simples ou por uma coluna multi-estágio em contracorrente.

O uso de modelos complexos de colunas, como por exemplo, o refluxo do espumado pode aumentar a eficiência de separação. Mas a estrutura de certos materiais como os biológicos pode ser afetada por repetidas atuações de quebradores de espumas (Santana, 1995).

Karger et al (1966) realizaram fracionamento de solutos termo-sensíveis de vegetais como a lecitina, com quebra mecânica da espuma. O aquecimento para quebra da espuma através de um condensador no topo da coluna provocava uma drenagem excessiva e evaporação ao longo das paredes, resultando em certos casos na formação de um sólido duro na parede da coluna.

Miguel (1987) relata que substâncias podem estar adsorvidas numa concentração maior na superfície do líquido que no interior do líquido, e neste caso diz-se a substância esta adsorvida positivamente. Substâncias adsorvidas em concentração maiores no interior do líquido que na superfície das bolhas, chamam-se substâncias adsorvidas negativamente.

Em 1903, Zawidski, citado em Berkman e Egloff (1934) estudou o fracionamento por espuma de soluções de saponinas, e entre suas conclusões podemos destacar:

- O estudo da distribuição de saponinas entre o solvente e a interface provou que saponinas presentes em soluções aquosas ácidas se concentravam mais na superfície. Este fato concorda com a relação entre viscosidade e tensão de bolhas aquosas investigadas por Plateau. A razão da concentração de saponina na espuma e na solução não era constante. Estes resultados foram confirmados por medidas de refratometria.
- O estudo da adição gradual de álcool em soluções aquosas de saponina levou a diminuição e posterior eliminação da habilidade espumante. Este fenômeno é explicável pela redução da tensão superficial pelo álcool.

Muitos fatores afetam a natureza, desenvolvimento e estabilidade das espumas. A natureza e a concentração dos componentes do sistema, assim como temperatura, pressão, pH e força iônica são variáveis primárias que determinam outras variáveis secundárias importantes, como viscosidade, tensão superficial e diâmetro de bolhas. Relações entre essas variáveis permitem estudos sobre a estabilidade e drenagem em leitos de espuma (Rubin e Garden, 1962).

Os estudos realizados comprovaram que a carga elétrica das proteínas afeta o poder espumígeno e a estabilidade das espumas a que dão origem. As curvas de poder espumígeno em função do pH assemelham-se ao perfil de solubilidade, isto é, possuem valores mais baixos na região isoeletrica (valor de pH no qual há um balanço entre cargas positivas e negativas na superfície da proteína) e mais altos acima ou abaixo desta região (Miguel, 1987).

Schutz (1943) citado em Rubin e Garde (1962) relatou que para proteínas a inclinação da curva da tensão superficial com a concentração é maior no ponto isoeletrico e a inclinação é menos negativa para cada valor de pH. O enriquecimento máximo é obtido no ponto isoeletrico. Como a proteína apresenta menor solubilidade no ponto isoeletrico, neste ponto a repulsão entre as moléculas é mínima. A igualdade das cargas possibilita uma maior concentração superficial da proteína devido a diminuição da repulsão entre as moléculas. Uma mistura de proteínas com diferentes pontos isoeletricos ou atividade superficial pode ser assim separado em componentes individuais, conforme usado por Ostemair e Dobias (1981) citado em Rosa (1996)

Matalon (1943) e Gotte (1951) citados em Lucena (1995) observaram máxima estabilidade de espuma na Concentração Crítica Micelar para o caso de tensoativos.

Uma coluna alta freqüentemente resulta em um produto mais concentrado. A altura da coluna de espuma está relacionada à concentração do material de atividade de superfície na solução e a velocidade superficial do gás. Uma coluna de espuma alta é instável mas pode ser obtida se a velocidade do gás for alta (Santana, 1995).

Um aumento na vazão de gás reduz a razão de enriquecimento. Com vazões altas de gás, a densidade de espuma é aumentada porque mais líquido da solução inicial é removido e o enriquecimento diminui. Pela redução do tamanho das bolhas, a área do filme da espuma é aumentada e ocorre aumento do material ativo transferido. Em situações em que não se formam espumas estáveis, pequenas bolhas são mais vantajosas. Para espumas muito estáveis tais como as produzidas pelas saponinas grandes bolhas são preferíveis a pequenas por causa de uma drenagem mais efetiva (Rubin e Garden, 1962).

Um aumento nas dimensões do aparato mantendo-se a vazão constante, freqüentemente melhora a separação. Pelo aumento da altura ou diâmetro da coluna, o tempo de residência da espuma na coluna aumenta e portanto mais líquido é drenado da espuma afinando as paredes das bolhas. Como resultado a concentração do tensoativo adsorvido na espuma aumenta. Um longo tempo de residência das bolhas de gás na solução líquida também aumenta a separação porque a concentração na interface gás-líquido aproxima-se do equilíbrio (Rubin e Garden, 1962).

Em alguns casos a temperatura afeta diferentemente a estabilidade da espuma pela redução da viscosidade e aumento da drenagem podendo ser usada como variável operacional para separar moléculas de superfície ativa (Rubin e Garden, 1962)

Barstch citado em Berkman e Egloff (1934) estudou a estabilidade de espumas pela adição de substâncias que aumentam a viscosidade. Ele realizou estudos com soluções de álcool isoamílico adicionando várias gotas de glicerol e glicol. A estabilidade ocorreu somente em concentrações acima de 6%. Barstch explicou o fenômeno pela Lei de Remoção de Michaelis e Rona: o glicerol e o glicol são parcialmente removidos das paredes da espuma pela existência de superfície ativa do álcool isoamílico.

Uma solução de sabão e saponina exemplificam essa lei. No caso a solução de sabão apresenta menor tensão superficial que a solução de saponina ocorrendo remoção do sabão da interface pela saponina. Boys citado em Berkman e Egloff (1934) reporta o experimento no qual uma gota de sabão adicionada a 30 g de saponina foi suficiente para prevenir a rigidez das bolhas de saponinas. A adição de 3 gotas tornou a espuma móvel e elástica como no caso de soluções de sabão puro.

2.5.3 APLICAÇÕES DO PROCESSO POR ADSORÇÃO EM COLUNAS DE BOLHAS E ESPUMAS

Segundo os últimos boletins divulgados pela CFA (1998) o processo de flotação foi reconhecido como método de separação de partículas (minérios) no início do século XX. Uma patente nos EUA foi concedida em 1905. Desde do início a flotação encontrou muitas aplicações tais como: separação de minérios, clarificação de efluentes de papel e celulose, tratamento de efluentes de refinarias, tratamento de esgotos pluviais e tratamento de esgotos municipais entre outros.

Para tratamento da água potável, o processo de flotação por ar dissolvido começou a ser utilizado na década de 1960 e hoje é amplamente utilizado na Holanda, Reino Unido, Ásia e Austrália. A origem deste tratamento proporcionou uma solução para tratamento de águas frias de difícil floculação, águas contaminadas com algas, águas com matéria orgânica e com pouca turbidez e alcalinidade. Este método diminui o uso de coagulantes sendo eficiente com flocos pequenos.

Mallevalle et al. (1980) relatam o estudo das técnicas de separação por fracionamento em bolhas para remoção da água de substâncias orgânicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos), micropoluentes orgânicos e micropoluentes minerais, transformando a água em potável.

O alto custo das operações de separação tradicionais na engenharia química como destilação e absorção quando aplicados a sistemas diluídos faz com que águas residuais, contendo solutos como tensoativos e proteínas, sejam lançadas diretamente em cursos de água, provocando a poluição. As vantagens dos métodos baseados na adsorção de componentes com atividade de superfície consiste na sua aplicação a temperatura ambiente, podendo se concentrar ou separar substâncias termo-sensíveis,

Santana (1997), e é um método de baixo custo para ser usado em sistemas onde outros métodos de separação encontraram restrições econômicas ou práticas.

Santana (1995) relata os trabalhos de Beszedits e Netzer (1982) e Beszedits (1980), Crikenberg e Carawan (1991) e Venkataramani (1992) sobre aplicações do uso de colunas de bolhas e de espumas para pré-concentração de soluções diluídas ou para remoção de substâncias indesejáveis comuns em fermentação, extratos vegetais e também tratamento de efluentes provenientes de indústrias alimentícias, farmacêuticas e bebidas..

Mohan e Lyddiatt (1994) relatam a utilização do fracionamento por espuma para concentração de proteínas a partir de cervejas comerciais e a utilização desta metodologia como um passo no processamento de efluentes de processamento de proteínas presente em baixas concentrações iniciais.

O levantamento bibliográfico apresentado a seguir dá ênfase aos casos em que se usou saponinas e naquelas em que se encontrou tensoativos já presentes na solução.

Brunner e Stephan (1965) relatam que o aumento da descarga de detergentes em rios pela população e pelas indústrias levou ao estudo de processos para remoção desses detergentes das águas residuais. O fracionamento por espuma foi a técnica utilizada por estes pesquisadores devido aos baixos custos de operação e de investimentos, mais a possibilidade de se usar a flotação para remoção dos sólidos suspensos nestas águas. Brunner e Stephan removeram detergentes biodegradáveis de águas residuais municipais. A remoção desses tensoativos a partir de efluentes pode ser efetuada em unidades de tratamento em escala piloto e grande escala, antes da descarga nos rios.

Miguel (1987) verificou a existência de sinergismo entre os tensoativos aniônicos e não-iônicos no fracionamento por espuma. A adição do não-iônico às soluções de tensoativos aniônicos, NaBDS e ABL (dodecil benzeno sulfonato de sódio e alquil benzeno sulfonato de sódio linear), que não formava espuma a baixas concentrações, aumentou o poder espumígeno e a estabilidade de espuma formada até a concentração de 5×10^{-4} M de tensoativo aniônico. Para concentrações maiores de tensoativo aniônico não houve alteração significativa do poder espumígeno. O poder espumígeno foi crescente com a concentração do não-iônico até a concentração de 2×10^{-5} M e decresceu para concentração de 5×10^{-5} M do não-iônico. Foi averiguada se esta propriedade apresentada pelo sistema era decorrente de um sinergismo com

relação ao abaixamento da tensão superficial. Em baixas concentrações de surfatante aniônico a tensão superficial da solução de dois tensoativos manteve-se praticamente igual àquela da solução do não-iônico sozinho na mesma concentração. Indicando que a atividade superficial do não-iônico independe da presença de tensoativo aniônico e que ele ocupa preferencialmente a interface gás-líquido. Com o aumento da concentração de surfatante aniônico começa a haver redução da tensão superficial da solução. Quanto maior foi a concentração volumétrica do não-iônico menor a concentração do aniônico requerida para completar a interface devido ao seu caráter tensoativo menor. Quanto maior a concentração do tensoativo não-iônico adicionado ao tensoativo aniônico (dodecil benzeno sulfonato de sódio e alquil benzeno sulfonato de sódio) maior foi a elevação da tensão superficial, sugerindo que a micela mista passa a ser preponderantemente composta pelo tensoativo aniônico a qual solubiliza o não-iônico no seu interior. A separação dos dois tensoativos (NaDBS e não-iônico) é seletiva e favorável ao tensoativo não-iônico. A massa de tensoativo recuperado no espumado é percentualmente muito maior para o não-iônico sendo que em algumas situações o aniônico não pode ser detectado.

Lemlich (1968) relata uma vasta revisão de trabalhos sobre fracionamento com espuma de tensoativos e o uso de tensoativos para complexação de íons metálicos de soluções diluídas e sua possível recuperação. Recentemente Santana (1995) resumiu os principais trabalhos na área de fracionamento por espuma para surfatantes. Em geral os dados obtidos com sistemas surfatantes não podem ser aplicados diretamente a sistemas envolvendo materiais biológico devido a grande diferença de tamanho molecular

Trabalhos mais recentes sobre surfatantes e as variáveis do processo e não relatados por Santana e Lemlich são os de Scamehorn et al (1996) e Stoica e Catuneanu (1992)

Scamehorn et al (1996) provaram a viabilidade da recuperação de surfatantes da água e analisou a influência das variáveis vazão de ar, altura de espuma, altura de líquido, concentração de surfatante na solução inicial. Os melhores resultados foram encontrados com a redução em 90% de cloreto de cetil piridínio em água, usando estágio com tempo de residência de 375 minutos. A concentração do surfatante no espumado foi 21,5 vezes maior que na solução inicial.

Stoica e Catuneanu verificaram a otimização das condições como, pH, requerimento de coagulante e concentração de surfatante, para extração de sulfonatos alquilbênicos linear das águas por DAF

Kichenko et al.(1976) estudaram o efeito de saponinas no fracionamento de espuma para tratamento de águas residuais de indústrias açúcar. Águas provenientes de refinarias de açúcar e cerveja foram tratadas por aeração por 4 minutos e sofreram 20 minutos de flotação em pH 8,5-9 em um tanque cilíndrico de 2 m de comprimento para remover 75-80% de impurezas e de 70-5% de saponinas.

Tashiro et al. (1994) estudaram o tratamento biológico de efluentes de águas de esgotos ou águas residuais orgânicas com adição de extrato de quilaia em tanque aerados.

Nagasaka (1995) estudou a adição de saponinas de quilaia no tratamento de águas residuária provenientes de indústrias processadoras de carne. O processo convencional consiste de tratamento biológico e pré-tratamento com flotação. A adição de saponinas de quilaia funcionou como um pré tratamento do efluente, evitando o uso do tratamento de flotação.

2.5.4 DRENAGEM E COALESCÊNCIA NO FRACIONAMENTO POR ESPUMA

A drenagem é um adelgaçamento nas lamelas das espumas sem que haja ruptura. O líquido presente na espuma drena por causa da gravidade e sucção pelas Bordas de Plateau.(Rubin e Garden,1962).

Daíds e Rídeal (1963) citado em Miguel(1987) relatam que a drenagem sob ação da gravidade se dá pela diferença de densidade entre o líquido e o gás fazendo com que o líquido desça continuamente do topo para a base da bolha. O líquido contido na espuma apresenta comportamento diferente. O movimento ascendente das bolhas de gás arrasta consigo as superfícies líquidas que se deslocam muito vagarosamente para cima, retardadas pela ação da gravidade.

Plateau em sua teoria sobre espumas assumiu que para que um líquido seja capaz de formar bolhas, desenvolver películas extensas e que tenham ainda resistência, é

necessário que a viscosidade superficial das películas seja suficientemente grande para tornar a drenagem da espuma vagarosa. Por outro lado é necessário também que a tensão superficial seja relativamente baixa para que não possa vencer a resistência oposta fornecida pela viscosidade. Tensões superficiais altas e viscosidade superficial baixa não formam bolhas porque as películas ficam extremamente finas em pequeníssimo tempo, o que as torna suscetível ao colapso a qualquer perturbação (Miguel, 1987).

A drenagem da espuma é afetada pela viscosidade do líquido que drena. Quanto menor a viscosidade maior a taxa de drenagem. Uma alta viscosidade do líquido inicial geralmente não é favorável. Um modo para superar este problema é o uso de altas colunas de espumas com longo tempo de drenagem. A literatura é contraditória em relação ao efeito da concentração na drenagem da espuma. Em alguns casos, a drenagem de espuma independe da concentração mas em outros a concentração tem influência substancial na drenagem da espuma (Rubin e Garden, 1962).

A velocidade superficial do gás tem efeito significativo nas taxas de drenagem com velocidade maiores diminuindo a taxa de drenagem e portanto diminuindo o grau de enriquecimento do produto de topo (Lucena, 1995).

Bradley e Ross, citados por Miguel (1987) relatam um método válido para avaliar a estabilidade de espuma, baseado no tempo de vida média do líquido na espuma (L_e) e o tempo de vida média do gás na espuma (L_g). Em uma espuma úmida e recém formada a perda do líquido se dá normalmente por drenagem. Neste caso o líquido será removido da espuma a uma taxa maior do que aquela na qual o gás é liberado ($L_g > L_e$).

Se por outro lado, a ruptura ou coalescência das bolhas ocorre antes que a drenagem tenha tido tempo de se estabelecer, então o gás é liberado da espuma mais rapidamente que o líquido e nesse caso, ($L_g < L_e$). Ocorre, por exemplo, na presença de um anti espumante, capaz de destruir películas relativamente finas.

A coalescência pode ser minimizada por altas vazões de gás e com uma coluna de espuma de pequena altura, pois são fatores que reduzem o tempo de residência (Lemlich, 1968).

Jacobi et al. (1956) apresenta a Equação 2.1 que foi utilizado em alguns trabalhos para estudo do fenômeno de drenagem de diversas soluções como cerveja, albumina de ovo, peptonas, gelatina e saponinas a várias concentrações.

$$V/V_0 = 1 - e^{-Ct} \quad (2.1)$$

Nessa equação V = Volume de líquido drenado

C = constante

V_0 = volume de líquido inicial na espuma

t = tempo

Jacobi et al. (1956) apresentaram curvas de drenagem obtidas por Airbuzov e Grebenschikov para soluções de saponinas. Ao contrário de uma operação típica, os ensaios foram conduzido com espuma de soluções aquosas de saponinas que eram succionadas através de um disco poroso de vidro para dentro do tubo. Essas curvas são exemplos de curvas de drenagem que sofrem inflexão. Um valor máximo da taxa de drenagem é alcançado em um curto intervalo de tempo e, a taxa de drenagem declina com o tempo. O máximo obtido nas curvas de drenagem é resultado da redistribuição do líquido dentro da coluna de espuma.

2.5.5 ADSORÇÃO NA INTERFACE GÁS-LÍQUIDO

Plateau foi o primeiro a estudar o comportamento das espumas e Gibbs adicionou conhecimentos termodinâmicos da interface gás-líquido a essa linha de pesquisa tendo sido o primeiro a desenvolver a isoterma de adsorção (Rubin e Garden, 1962).

O fenômeno da adsorção interfacial a nível termodinâmico foi teorizado por Gibbs (1937) e resultou na Equação de Gibbs da adsorção interfacial. Em condições de equilíbrio para soluções diluídas, a adsorção de uma dada espécie numa interface gás-líquido é dada pela Equação 2.2

Gibbs provou que a adição de um soluto reduz a tensão superficial do solvente. O decréscimo na tensão superficial é resultado da adsorção positiva do soluto. O modelo proposto para uma isoterma de adsorção por Gibbs é uma relação entre a concentração superficial em excesso e a concentração no interior da solução, numa dada temperatura (Berkman e Egloff, 1934).

$$\Gamma = - 1/ RT (d\gamma / d\ln C) \quad (2.2)$$

Γ = é a concentração superficial em excesso do soluto, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, γ é a tensão superficial e C é a concentração do soluto no interior da solução.

A Equação de Gibbs descreve matematicamente a obtenção de Γ a partir da curva γ versus $\ln C$. Se a tensão superficial da solução diminuir com o aumento da concentração do soluto, então $(d\gamma/d\ln C)$ é negativo. Sendo Γ positivo existe um excesso de soluto na interface (Castelan, 1973).

No entanto, resultados experimentais de γ versus $\ln C$ nem sempre caem na faixa da aplicabilidade da Equação de Gibbs. Esta equação é limitada para faixas de concentrações onde ocorre apenas a formação da monocamada. O comportamento de Γ com C é portanto válido até a saturação da monocamada. (Lucena, 1995).

A Equação de Gibbs foi aplicada por muitos pesquisadores, que encontraram uma grande diferença entre valores experimentais e teóricos. Shorter citado em Berkman e Egloff (1934) concluiu que a teoria de Gibbs é aplicável nos casos nos quais o processo de formação da camada superficial é simples e reversível. Experimentos de Shorter com camadas superficiais formadas por soluções de saponinas, peptonas e albuminas mostraram que o processo é termodinamicamente irreversível e portanto fora do escopo da Equação de Gibbs.

Com relação a estrutura da camada de Gibbs e a formação de espuma, dois casos extremos merecem consideração (Berkman e Egolf, 1934):

- Quando a concentração é infinitamente pequena, a camada de Gibbs é composta de moléculas de água.
- Quando a concentração é infinitamente grande, por exemplo saturada, a camada de Gibbs consiste de moléculas de substâncias de superfície ativa.

3.MATERIAL, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO

Neste capítulo serão listados os materiais, reagentes, equipamentos e outros suprimentos utilizados, assim como métodos e equações desenvolvidas para a obtenção dos resultados.

3.1 MATERIAL

3.1.1. SAPONINAS

O extrato de quilaia foi adquirido da Sigma Chemical Co, U.S.A. Em todos os experimentos foi utilizado um mesmo lote de saponinas de quilaia (105H713S790).

O produto tem a aparência de um pó fino, de coloração bege, com aroma típico e gosto amargo.

A composição química fornecida pelo fabricante é:

13,7% Sapogenina	3,19 % K	0.46% S
44,3% C	1,54 % Ca	0,22% P
14,6 % Cinzas	1,08 % Mg	0,16% Na

A cromatografia em papel indicou a presença de pelo menos 7 componentes no extrato de quilaia.

Uma análise centesimal de seus principais constituintes foi feita, a pedido, pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas, e indicou:

23,40% Açúcar totais
19,67% Açúcar redutores
11,22% Cinzas
6,91% Umidade
6,23% Tanino
1,40% Proteínas
0,70% Fibras

3.1.2 REAGENTES E ADITIVOS

- Água desionizada Milli Q (Millipore, USA)
- Hidróxido de sódio (Solução 0,1 N) Merck
- Ácido clorídrico (Solução 0,1 N) Merck
- Ácido acético – Merck – Grau P.A
- Metil celulose (Metocel – 4 M – Dow Química, USA)
- Alginato (Kelcoloid – Kelco Division of Merck & Co, USA)

A composição química fornecida pelo fabricante do Kelcoloid é:

Matéria seca 92%	
Esteres 86,8%	Alginatos de Sódio 9,5%
Ácidos Livres 3,0%	Alginatos de Cálcio 0,8%

Uma análise microbiológica do produto não indicou presença de salmonela ou coliformes e a viscosidade (solução 2%) é 110 cP a pH 4,0.

- Hexano- Merck – Grau P.A
- Acetonitrila Omini Solv Grau HPLC
- Acetonitrila – Merck - Grau HPLC
- Butanol - Merck – Grau P.A
- Ácido Tânico – Merck – Grau P.A
- Metanol Merck – Grau P.A
- Glicerol – Merck – Grau P.A
- Acetona – Meck – Grau P.A

3.1.3. EQUIPAMENTOS E OUTROS SUPRIMENTOS

- Balança Analítica, modelo Analytical Plus, Ohaus, Alemanha
- Balança Ohaus, Precision Advanced, Alemanha
- Estufa à vácuo marca Fanem modelo 099 Ev
- PHmetro WTW, modelo pH 320
- Placa com agitação Fisatom
- Tensiômetro K₁₂ modelo Kruss, Kruss Gmbh, Alemanha
- Tensiômetro automático K5v – Modelo Sigma 701 - F5V – instruments LTDA
- Espectofotômetro Hitachi U – 2000
- Espectofotômetro Beckman - DU - 70
- Banho Shaker com temperatura e agitação controlada (Lab Line)
- Banho criostático Haake, modelo K com temperatura controlada
- Conjunto Soxhlet – Fisatom
- Paquímetro – Somet

- Rotâmetro Gilmont, USA
- Gás de arraste :
- Nitrogênio comercial – Oxigênio do Brasil
- Ar comprimido – Obtido do Laboratório de Calibração – FEQ- UNICAMP

3.2 MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO

3.2.1 PRÉ TRATAMENTO DO EXTRATO DE QUILAIA

Nos ensaios preliminares realizados na coluna de fracionamento por espuma foi utilizado extrato de quilaia desengordurado em extrator Soxhlet com acetona.

Para cálculo da CMC e os ensaios definitivos o único pré-tratamento para a quilaia foi o desengorduramento com hexano à 25°C. O uso de baixas temperatura é recomendado por Ruiz et al (1995), que descobriu a presença de artefatos oriundos da degradação e associações de saponinas quando se usava o extrator Soxhlet à pressão atmosférica.

Cerca de 20 g de Quilaia eram colocadas em erlenmeyer de 250mL, com 100mL de hexano. O conteúdo era colocado em banho de agitação orbital, à temperatura constante de 25° C, 150 rpm por 48 horas. Deixava-se decantar e separava-se o sobrenadante. O sólido era lavado com hexano e levado à estufa à vácuo por 24 horas a uma temperatura inferior a 40° C. O sólido final foi previamente selecionado de forma a fornecer um pó uniforme que era conservado em geladeira, e foi a matéria prima de todos os ensaios. Antecedendo a cada uso, o produto era deixado por 12 horas em estufa à vácuo a 40° C para retirada da umidade.

3.2.2 PREPARO DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE QUILAIA

As soluções aquosas de quilaia na concentração desejada foram preparadas com água desionizada, à temperatura ambiente, sobre placa agitadora. O pH da solução, lido com pHmetro, era corrigido com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio até o valor definido do ensaio.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA

Foi preparada uma solução aquosa de extrato de quilaia com água desionizada a pH 3,0, na concentração de 0,02 g/mL. A partir desta solução foram preparadas 12 amostras, por diluição, sendo a menor concentração 2×10^{-7} g/mL. Cada concentração foi obtida diluindo-se a solução inicial com água desionizada a pH 3,0, verificando-se o pH final da solução com pHmetro e corrigindo quando necessário.

Para medição da tensão superficial foram retirados 50 mL destas soluções. As medidas da tensão superficial, foram realizadas em dois tensiômetros diferentes e as metodologias adotadas são comentadas abaixo:

- Um tensiômetro modelo K12 Processor Tensiometer (Kruss), equipado com uma placa de platina iridiada. Cada ciclo de medidas neste aparelho equivale a imersão da placa e a tomada continua de medidas a intervalo de 15 segundos até alcançar o critério de parada pré –estabelecido.

As metodologias adotadas foram:

- 1) Deixava-se a amostra uma hora em repouso sobre a balança, no tensiômetro Kruss, para se chegar ao equilíbrio, e somente então a placa era mergulhada na mesma iniciando-se as leituras. Adotava-se como critério de parada da leitura, um valor menor ou igual a 0,20mN/m do desvio padrão da média das cinco últimas medidas. A tensão superficial de cada ciclo era a média das cinco últimas medidas e a tensão superficial da amostra era a média da tensão superficial dos ciclos efetuados. Foram efetuados no

mínimo dois ciclos de leituras. Esta metodologia é uma variante da adotada por Sundfeld (1995)

2a) Mergulhava-se a placa e fazia-se sucessivas leituras da tensão superficial até obter um desvio padrão de $0,01\text{mN/m}$ entre as cinco últimas medidas. A tensão superficial era a média das cinco últimas medidas. Sem iniciar um novo ciclo de medidas (imersão da placa) realizava-se nova determinação controlando-se o aparelho para efetuar as leituras do ponto em que o sensor da balança do tensiômetro foi anteriormente zerado. As leituras da tensão superficial feitas até atingir o desvio de $0,01\text{mN/m}$ entre as cinco últimas medidas. A tensão superficial da amostra era a média dos ensaios realizados.

2b) Repete-se a metodologia 1, sem espera de hora para leitura das tensões superficiais (Sundfeld, 1995)

- Um tensiômetro K5V automático acoplado a um micro computador 386 e equipado com uma placa de platina-irídio.

As metodologias adotadas foram:

3a) A placa é mergulhada a cada minuto, sendo que cada mergulho corresponde a uma medida da tensão superficial. As medidas foram tomadas durante 1 hora no Tensiômetro K5V. A tensão superficial é a média das cinco primeiras medidas.

3b) Com os valores obtidos pela metodologia 3a calcula-se a tensão superficial da amostra como a média das cinco últimas medidas.

Construíram-se gráficos da tensão superficial *vs* logaritmo da concentração de solução aquosa de Quilaia, a pH 3,0, que serviu para a determinação da CMC. As tabelas com os valores obtidos para cada caso estão apresentadas no Capítulo 4, e no Apêndice A encontram-se tabelas e gráficos de cada situação de ensaio.

Duas retas foram ajustadas aos pontos experimentais alinhados antes e depois da região de descontinuidade, seguindo o método empregado por Sundfeld (1995), e por Lardet e Thomalla (1988). A CMC é o valor da concentração da solução correspondente a interseção dessas retas. Um exemplo está apresentado na Figura 3.1

O ajuste das retas foi feito utilizando regressão linear pelo programa Grapher versão 1.28 em um PC em ambiente Windows 95 e processador Pentium 166Mz.

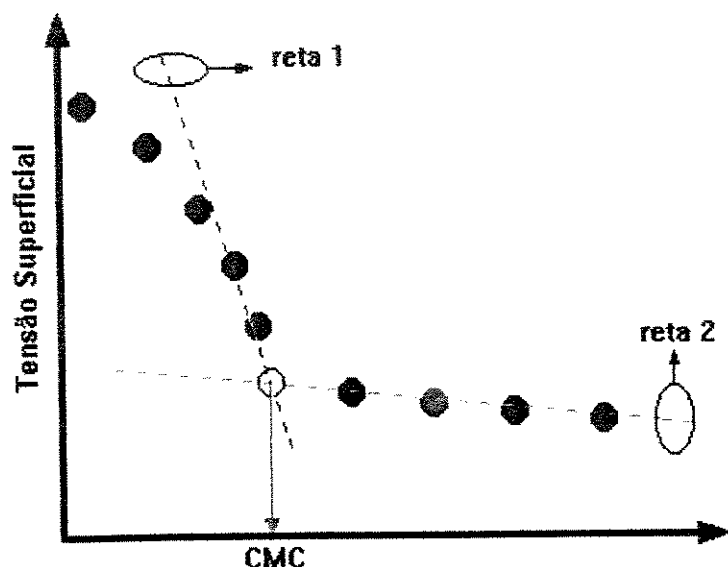


Figura 3.1 Determinação gráfica da concentração micelar crítica (CMC) (Sundfeld, 1998)

Baseado nos resultados apresentados no Capítulo 4 o método escolhido foi o de Sundfeld (1995), o qual mostrou ser o mais confiável e preciso. Os procedimentos completos usados estão descritos a seguir.

As leituras foram realizadas utilizando-se o Método da Placa de Wilhelmy, com Tensiômetro Kruss, equipado com placa de platina iridiada com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento 19,9 mm e espessura de 0,10 mm. O tensiômetro foi acoplado a um banho termostático Haake, para leituras das tensões à temperatura constante de 25°C. As medidas foram feitas a partir da diluída para a mais concentrada, de modo a minimizar o efeito de contaminação entre amostras. Foram feitos dois ciclos de medidas. Considera-se a média destas como a tensão superficial da solução. A checagem do aparelho foi feita previamente ao início das medidas, através da determinação da tensão superficial da água desionizada utilizando o valor tabelado da tensão superficial da água igual a 72,57mN/m (20°C) e 75,60 (0°C) (Rabockai, 1979)

3.2.4 ENSAIOS PRELIMINARES

Apesar das reconhecidas propriedades espumantes das soluções de saponinas, apenas referência antigas foram encontradas na literatura, sendo que estas não enfocavam a purificação, mas sim o comportamento e estabilidade da espuma de saponina (Zawidski, 1903 citado em Berkman e Egloff, 1934; Schutz 1942). Referências atuais são de difícil acesso por se tratarem de patentes japonesas ou russas com poucos esclarecimentos quanto a caracterização da espuma (Nagasaka, 1995; Tashiro, 1995; Kiechenko et al., 1978).

A fim de se familiarizar com o processo proposto e estabelecer condições e limites de trabalho adequados para o tratamento de soluções de saponinas, foram feitos levantamento preliminares com versões simplificadas de colunas. Nesta etapa fez-se uso de recursos e dos conhecimentos sobre o assunto disponíveis no Laboratório de Biosseparação (DTF/DPB, FEQ) e no DEA/ FEA.

Versão I -Tubo de 30 cm

Foram realizadas pesquisas exploratórias para avaliar o efeito da concentração de quilaia e da vazão de alimentação do gás e sua pressão no fracionamento. O sistema era constituído por um tubo de vidro, tipo bureta, funcionando como uma coluna pequena de diâmetro interno de 0,183 cm e com 30 cm de altura, contendo de 10 a 20 mL de solução. O gás de arraste foi ar comprimido escoando através de placa porosa, para geração das bolhas. A vazão era controlada por uma válvula agulha e medida por um rotâmetro de modo que o agente tensoativo (saponina) presente no sistema produzisse espuma em condições de chegar ao topo do tubo vertical antes de colapsar. Controlou-se a pressão através de um tubo em U. As concentrações de solução de quilaia utilizadas situavam-se na faixa de 200 a 20000 mg /L. Essa faixa de valores, segundo trabalhos de Sundfeld (1995), correspondia à região da CMC.

Versão II - Tubo de 100cm

Em uma versão ampliada do equipamento avaliou-se o efeito de aditivos, do pH e do volume da solução inicial (Si) no comportamento da espuma na coluna de fracionamento e tentou-se monitorar as composições químicas.

O equipamento básico era constituído por um tubo de vidro de 100 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro interno, com um disco de vidro sinterizado acoplado à sua extremidade inferior para servir como dispersor de gás. Antes de entrar na coluna o nitrogênio borbulhava por um saturador de umidade. A coluna era carregada com solução inicial (Si). Em seguida iniciava-se a passagem de nitrogênio pela amostra controlada por uma válvula agulha. A pressão em torno de 3-4 kgf/cm² no cilindro, e a vazão constante em 13,60 mL/min era suficiente para evitar gotejamento do líquido que se mantinha acima da placa porosa. Uma fotografia do equipamento usado encontra-se na Figura 3.2. Os ensaios foram dados como encerrados quando a solução residual não era mais capaz de formar espuma estável que pudesse ser coletada.

O monitoramento do enriquecimento em saponinas foi feito segundo a técnica cromatográfica HPLC desenvolvida por Grassi et al (1996). Alguns resultados obtidos foram apresentados por Oliveira e Kieckbusch (1996). Esses resultados obtidos, entretanto, são inconsistentes e são comentados no APÊNDICE C.

• Volume de solução inicial (Si)

Dois volumes diferentes de solução inicial foram avaliados, com concentração abaixo, acima e em torno da CMC. O volume de 245 mL correspondia a uma altura de líquido de 24,5 cm, e o de 450 mL, a 45 cm da coluna.



Figura 3.2. Esquema da coluna de fracionamento como tubo de 100cm de altura

- **Escolha de aditivo**

Conforme citado na Seção 2.4 uma maior estabilidade de espuma facilita a drenagem de líquido, melhorando o enriquecimento. Com essa finalidade, avaliou-se o comportamento da espuma produzida com três aditivos diferentes a várias concentrações: Alginatos (Al), Metilcelulose (Me) e Glicerol. Esses compostos aumentam a viscosidade dando maior estabilidade a espuma através da formação de membranas muito viscosas, semi-rígidas ou tipo gel, na interface e que fornecem uma certa elasticidade às camadas interfaciais, evitando a coalescência das bolhas na espuma por mais tempo. O glicerol adicionado a soluções aquosas de saponinas induz um aumento

da viscosidade local entre as bolhas e com o tempo produz um espumado com camadas leves e flexíveis, permitindo fracionar soluções mais concentradas, pelo aumento da drenagem sem ocorrência da coalescência (Berkman e Egloff, 1934)

Os ésteres de metil celulose e ésteres de alginatos, além das características citadas acima podem se associar a outras substâncias interferentes. Ésteres de alginatos formam ligações cruzadas com as glicoproteínas proporcionando rigidez a película que rodeia as bolhas (Hough,1990) e, ambos diminuem o efeito de competição de interferentes na superfície das bolhas, facilitando a adsorção preferencial das saponinas e sua melhor purificação.

- **Efeito do pH**

Os estudos do comportamento da espuma na instalação com tubo de 100 cm foram completados com a avaliação do efeito do pH da solução, usando ou não glicerol.

- **Versão III- Tubo de 175 cm**

A coluna utilizada foi aumentada até 1,75m, conservando-se toda a metodologia operacional citada na Versão II.

Baseado-se nos trabalho de Lucena (1995) e Miguel (1987) cujas condições de operação estão reproduzidas na Tabela 3.1 aumentou-se a coluna de fracionamento por espuma, obtendo-se a terceira versão. O aumento da coluna permitiu trabalhar com maiores valores de altura da solução inicial, possibilitando a saturação da monocamada na coluna de bolhas da solução.

Uma série de ensaios de fracionamento por espuma foi realizada nesta instalação, observando-se o comportamento da espuma frente a diferentes volumes da solução inicial. O monitoramento do enriquecimento em saponinas foi realizado utilizando-se a técnica cromatográfica HPLC desenvolvida por Grassi et al (1996) descrita no Apêndice C, onde também se encontram os resultados obtidos.

Tabela 3.1 Parâmetro geométrico da coluna de fracionamento por espuma

Parâmetro	Miguel (1987)	Lucena (1995)
Diâmetro interno	3,68 cm	3,2 cm
Altura da coluna	-----	105 cm
Volume da coluna	2,13 l	-----
Volume de solução fracionada	-----	1000ml
Altura de Si fracionada	2metros	-----

- **Avaliação do volume de Si**

Com a solução inicial (Si) a 400mg/L e a vazão de nitrogênio de 13,56 mL/min avaliou-se o efeito da altura de Si no fracionamento por espuma. Os volumes de solução inicial testados foram 750 (121,5 cm), 500 (87 cm), 380mL (60 cm)) e 300mL (47,4). Os ensaios foram realizados sem ajuste do pH original da solução de quilaia.

- **Variação da altura da coluna**

Como a coluna era unida por juntas esmerilhadas, foi possível variar a altura da coluna de fracionamento mantendo-se constante a concentração de Si= 400mg/L a pH 3,0, vazão de nitrogênio de 13,56 mL/min e volume de Si 300 ml.

3.2.5 ENSAIOS DEFINITIVOS

- Operação da coluna de espuma

O aparato utilizado no levantamento final de dados consiste de uma coluna de

vidro *pyrex* de 182 cm de altura (do centro do coletor até a superfície da placa porosa) com 2,81 cm de diâmetro externo e 2,50 cm de diâmetro interno operando em semi-batelada, estágio simples e sem refluxo. Um esquema da instalação está apresentado na Figura 3.3 A coluna era composta de três seções (50,4, 57,6, e 74,2 cm) conforme indicado na figura, unidas por juntas de *teflon*. Não se usou camisa de água, para controle da temperatura. Todos os ensaios foram feitos na temperatura ambiente, do laboratório (de 23 a 27 °C), mantida por aparelho de ar condicionado.

Um distribuidor consistindo de um disco de vidro sinterizado foi fixado no fundo da coluna, local de entrada do gás de borbulhamento. O gás utilizado para arraste foi nitrogênio comercial; antes de entrar na coluna o nitrogênio era saturado de umidade borbulhando em água destilada contida num saturador (altura de água destilada, 10cm). e era controlada por válvula agulha e medida por um rotâmetro. A curva de calibração do rotâmetro está apresentada e discutida no Apêndice B. A tubulação que conectava o cilindro de nitrogênio à válvula (cerca de 1,50 m) era de cobre, 1/4 polegada. A conexão entre o rotâmetro e à entrada na coluna era de mangueira de silicone com 9,5 mm de diâmetro externo

Para recolhimento do espumado, o topo da coluna se transforma em uma curva suave, de mesmo diâmetro interno, levando a um prolongamento lateral em ligeira inclinação em relação ao plano horizontal para possibilitar a saída da espuma arrastada pelo gás. Um frasco coletor (geralmente becher *pyrex* entre 600 - 2000 ml) previamente tarado coleta a espuma. A massa de espumado era determinada por diferença de peso. Para a quebra da espuma (colapso) o coletor era colocado por 12 horas em uma estufa (uma geladeira de isopor, 32 x 37 x 50 cm) , com uma lâmpada de 20 W que mantinha uma temperatura de cerca de 40°C. Após o colapso deixava-se esfriar o frasco que era então pesado. Completava-se a massa de água evaporada na estufa com água deionizada, no mesmo pH da solução de inicial

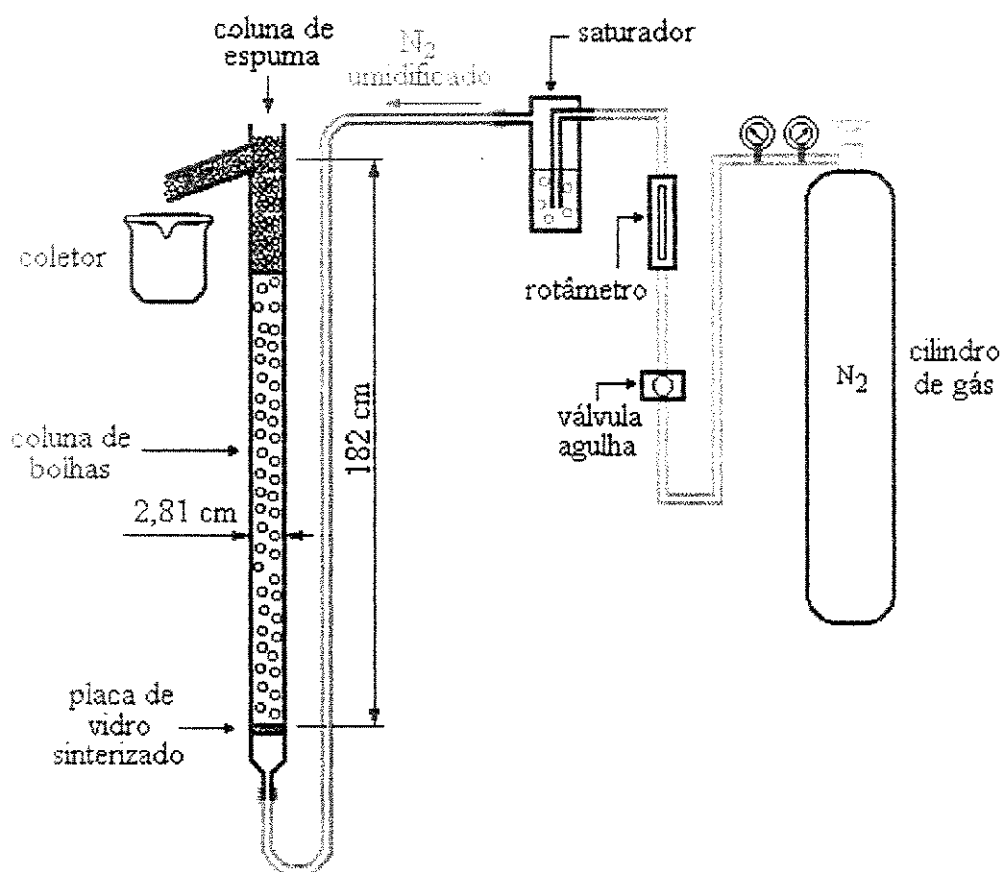


Figura 3.3 Esquema da instalação definitiva da coluna de fracionamento

Em uma operação de fracionamento típica alimentava-se a coluna com Si até a altura desejada de líquido (152-158 cm), medida com uma régua, colocada externamente. Em seguida abria-se a válvula de agulha até a vazão de nitrogênio desejada. Quando surgiam as primeiras bolhas na coluna de líquido marcava-se o tempo inicial. As bolhas de gás ao se destacarem da coluna de bolhas, provocaram o surgimento de uma coluna de espuma. A espuma formada era arrastada pelo gás sendo então coletada pela saída lateral superior. A operação era dada como encerrada quando a espuma não apresentava mais estabilidade para ascensão não podendo ser recolhida. Aumentava-se então a vazão de nitrogênio para que expulsasse a espuma que estava acima da Sr (solução residual). O fornecimento de gás era interrompido quando esta espuma se rompia e não podia ser mais coletada. Fazia-se a leitura de hf e registrava-se o tempo de operação. A Sr era então recolhida da coluna para análise.

Para evitar a proliferação de fungos principalmente na faixa CMC e acima desta,

as amostras de Si, Sr e Se foram conservadas congeladas em *freezer* até execução das análises

A coluna era então lavada várias vezes com água destilada, seguida de solução clorada e enxaguada mais quatro vezes com água destilada para evitar a formação de fungos na placa.

3.2.5.2 Determinação do volume de solução

As soluções inicial e residual tiveram seu volume calculado baseando-se na altura inicial (h_i) e final (h_f) lida no início e no fim do processo. O diâmetro externo da coluna foi medido com auxílio de um paquímetro sendo igual a 2.81 cm.

3.2.5.3 Determinação da massa de espuma

Em todos os ensaios serão usados as seguintes formulas e princípios para cálculo da massa de espuma.

A espuma coletada era pesada quando o frasco coletor estava cheio. Cada fracionamento poderia utilizar um ou mais frascos coletores dependendo da quantidade de material produzida. Se o material era insuficiente para poder realizar todas as análises, repetia-se o fracionamento partindo-se de nova solução inicial e procurando manter as mesmas condições anteriores.

Sempre se considerou a densidade do espumado igual a da água (1 g/cm^3)

A massa de espuma é dada pela Equação [3.1].

$$m_e = m_{if} - m_i \quad [3.1]$$

onde

m_e = massa de espuma coletada (g)

m_i = massa inicial do coletor (g)

m_{if} = massa do coletor mais a espuma (g)

Após o colapso da espuma, a massa de espuma evaporada era completada com massa de água no mesmo pH da solução de alimentação.

$$m_{ev} = m_{ir} - m_f \quad [3.2]$$

onde:

m_{ev} = massa de espuma evaporada (g)

m_f = massa do coletor mais espuma colapsado (g)

m_{ir} = massa do coletor mais espuma recolhida (g)

3.2.5.4 Caracterização do Enriquecimento de Tensoativos na Espuma

Por definição o índice de enriquecimento de um componente da solução de alimentação em um processo de fracionamento por espuma é a razão entre a concentração do componente no espumado e a concentração inicial, na solução a ser espumada.

Como não se conseguiu desenvolver uma metodologia analítica para determinar quantitativamente a concentração das diversas saponinas nas fases líquidas, foi necessário fazer uso de técnicas alternativas.

O índice de enriquecimento do processo de fracionamento de espuma foi calculado através dos seguintes métodos comparativos:

- Concentração de sólidos na espuma, resíduo e inicial, através do peso seco.
- Aumento de absorbância através de varreduras em espectrofotômetro UV/ Visível das soluções de inicial, resíduo e espuma.
- Comparação entre as concentração das soluções Si, Se .Sr através do valor do número de titulações necessárias para que a tensão superficial das soluções inicial, residual e espuma tenham valores próximos a tensão superficial da água.

A espuma, solução residual e inicial tiveram sempre o pH medido com pHmetro. Quando a quantidade de espuma colapsada tinha um volume insuficiente, media-se seu pH após reposição da massa de água evaporada

a.) Monitoriamento por massa seca

Cápsulas de vidro (*pyrex*) eram previamente aquecida a 60° C por 12h em estufa à vácuo; resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. Um determinado volume de Si, Sr e todo o volume de Se (medido com proveta) eram transferido para essas cápsulas. As soluções eram evaporadas em banho-maria até secura. As cápsulas eram novamente levadas à estufa à vácuo a 60° C por 36h, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. A massa seca na espuma M(Se) era obtida diretamente pela diferença de peso. Conhecendo-se os volumes totais de Si e Sr calculava-se os sólidos totais na alimentação M(Si) e no resíduo M(Sr) assim como sua concentração.

A razão entre os diferentes sólidos totais serviram como indicativo nas comparações entre os processos usados.

Índice de enriquecimento por massa seca

$Ems = \{ [M(Se)/Ve] / [M(Si)/Vsi] \}$	[3.3]
--	--------------

M(Se) massa de sólidos no espumado, mg

M (Si) massa de sólidos na solução inicial fracionada

Ve volume de espumado, mL

Vsi volume de solução inicial alimentada a coluna, mL

b) Monitoramento pela absorbância no espectrofotômetro

Amostras de Si, Sr, e Se eram submetidas a uma varredura em espectrofotômetro.

Obteve-se os espectros de absorção Si, Sr e Se e por inspeção, baseando-se também em dados da literatura. Definiu-se uma faixa de importância de comprimento de onda, no caso de 190 a 240 nm. As medidas da absorbância eram feitas a cada 2 nm de intervalo de comprimento de onda.

As amostras que extrapolaram a linearidade da equação de Beer, (absorbâncias maior que 0,8 u.a) ou o limite de confiabilidade do aparelho, (de 0,2-1,3 ua) foram diluídas. Retirou-se aliquotas destas soluções e diluiu-se em balão volumétrico com água desionizada no pH da Si do ensaio realizado.

Para uma estimativa do enriquecimento em saponinas obtido no fracionamento por espuma, assumiu-se uma relação linear entre a absorbância lida no intervalo de 190 (ou 200) a 240 nm, e a concentração de saponinas no espumado. Pela regra do Trapézio determinou-se a área total nos espectros de absorbância nesse intervalo e o Índice de Enriquecimento por absorbância, Ea é calculado pela Equação 3.4.

Índice de enriquecimento por absorbância (Ea)

$Ea = \{Ae / [(Ai - Ar)]\}$	[3.4]
-----------------------------	-------

onde:

Ae = área total de absorção da espuma na faixa considerada

Ai = área total de absorção da alimentação na faixa considerada

Ar = área total de absorção do resíduo na faixa considera

c) Monitoriamento pela Tensão Superficial

As amostras mantidas no *freezer* para análise eram retiradas e colocadas em banho termostaticado até atingir a 25°C.

As leituras da tensão superficial foram feitas conforme indicado na Seção 3.2.3.

Em todos os ensaios a tensão superficial do espumado sempre foi da ordem da tensão superficial da CMC. Este é um resultado esperado, mas como ele corresponde a

um valor limite constante, não permitiu uma estimativa da concentração. Procedeu-se então a uma sequência de diluições, retirando-se metade do volume da solução utilizada em uma leitura e repondo com o mesmo volume em água, ao mesmo pH da solução de inicial (S_i). Após cada diluição, determinava-se a tensão superficial, e a sucessão de diluições era encerrada quando o valor achado se confundia com a tensão superficial da água. A concentração do espumado foi estimada por peso seco e a concentração das demais diluições foi obtida dividindo-se o valor da concentração do espumado sucessivamente por dois.

A tensão superficial do espumado serviu de índice de comparação de enriquecimento em tensoativo em relação a tensão superficial do resíduo e solução inicial. Com a concentração do espumado encontrada por peso seco construiu-se a curva da tensão superficial vs diluição do espumado. Calculou-se a CMC do espumado e comparou-se com a CMC de S_i servindo de índice de comparação de enriquecimento de tensoativos na espuma o qual foi denominado enriquecimento pela tensão superficial, E_σ , e calculado pela Equação 3.5

Enriquecimento pela Tensão Superficial

$E_\sigma = \frac{\text{concentração do espumado em múltiplos de CMC}}{\text{concentração da solução inicial em múltiplos de CMC}}$	$3.5]$
---	--------

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente este capítulo apresenta os valores encontrados para a CMC do extrato de quilaia.

As dificuldades enfrentadas nos ensaios iniciais de fracionamento por espuma e os resultados encontrados serão abordadas e forneceram antecedentes para o desenvolvimento dos ensaios definitivos de fracionamento por espuma descritos e analisados neste Capítulo.

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

4.1.1 ESCOLHA DO MÉTODO E DO EQUIPAMENTO

O extrato de quilaia utilizado nos ensaios iniciais, para preparo das soluções aquosas de quilaia foi desengordurado com acetona em Extrator Soxhlet por várias horas.

A Tabela 4.1 compara o desempenho dos dois tensiômetros usados. Calculou-se a CMC em todos os levantamentos de dados nas três metodologias utilizadas, conforme, descrito no Capítulo 3. As equações das retas superior e inferior, são apresentadas, definindo-se a CMC como o ponto de interseção destas retas.

As tabelas e os gráficos utilizados que deram suporte para a construção da Tabela 4.1 encontram-se no Apêndice A.

Não se conseguiu uma leitura constante para a tensão superficial (T_s), com a Metodologia 2, mesmo realizando seis medidas consecutivas. Observou-se uma queda

continua na leitura do valor da tensão superficial, principalmente para soluções aquosas de saponinas na faixa de 10-80 mg/L. Estes dados são apresentados no Apêndice A.

Tabela 4.1 Valores da CMC a pH 3,0, com as três metodologias

Metodologia	Equações da Reta	CMC
1	$y = -0,07887x + 38,205$	Reta inferior
Espera de 1 hora	$y = -5,85313x + 15,7805$	Reta superior
		CMC 132 mg/L
2A	$y = 0,43306x + 39,9321$	Reta inferior
Leitura até desvio de 0,01	$y = -5,94901x + 14,1021$	Reta superior
		CMC= 90 mg/L
2B	$y = -0,557166x + 40,7013$	Reta inferior
Sundfeld (1995)	$y = -10,4102x - 5,74693$	Reta superior
Leitura até desvio de 0,20		CMC= 58,5 mg/L
3A	$y = -0,28926x + 35,7866$	Reta inferior
Tensiômetro K5V	$Y = -10,6468x - 5,36057$	Reta superior
Leitura com os primeiros pontos		CMC= 106,1 mg/L
3B	$y = -0,67247x - 34,2933$	Reta inferior
Tensiômetro K5V	$Y = -8,85563x - 1,3335$	Reta superior
Leitura com os últimos pontos		CMC= 93,8 mg/L

Ao verter-se a solução aquosa de saponina para as cubetas, ocorre a formação de espuma. Na Metodologia 1 é necessário o tempo de espera de 1 hora antes de se iniciar a leitura da T_s , para possibilitar o colapso dessa espuma eliminando-a da placa no momento da leitura. Com o emprego da Metodologia 2, a leitura de T_s é efetuada imediatamente, permanecendo muitas vezes a espuma sobre a placa. Esse fato explica a diferença encontrada nos resultados.

No tensiômetro K5V ocorre a perturbação da superfície a cada medida e com isso um deslocamento do equilíbrio a cada intervalo de tempo pré-determinado. Diferentemente, no tensiômetro Kruss a placa é mergulhada a cada ciclo de medidas. A partir deste momento, o aparelho faz a leitura contínua da tensão superficial (com a placa permanecendo mergulhada) até se alcançar o desvio padrão pré-estabelecido.

Por analogia ao trabalho de Foulk e Miler (1931), é provável, que a diferença entre os valores encontrados pode indicar uma relação entre a tensão superficial dinâmica e a Metodologia 3A, assim como, entre a tensão superficial estática e a Metodologia 1. A demora para alcançar o equilíbrio pode estar relacionada com a cinética de formação de micela mista (saponina-tanino-proteína), que compete com a adsorção de monômeros de saponinas na superfície.

A metodologia descrita por Sundfeld (1995) e que foi relatada no Capítulo 3, foi utilizada no cálculo da CMC para os pHs 3,0, 5,0 e 7,0. O método foi adotado por se acreditar que o efeito de envelhecimento da superfície, a evaporação do solvente e a oxidação e a redução da amostra fossem mais significativos na medição da tensão superficial do que o efeito ocasionado pela demora para as moléculas de saponinas difundirem à superfície do líquido e alcançarem o equilíbrio.

Os valores encontrados pelo Tensiômetro K5V poderiam ser usados para avaliar o tempo que a saponina levaria para adquirir uma conformação estável na superfície. Mas é difícil prever um tempo para o início das medidas, pois ele está diretamente relacionado com a difusividade que é função da concentração e do pH. O tempo utilizado (1 hora) pode ser considerado curto ou longo, dependendo da situação. Como a concentração da espuma é desconhecida é impossível determinar o tempo para a leitura da tensão superficial. Desta forma, não se calculou a cinética de adsorção da saponina na superfície, para cada concentração.

4.1.2 CURVA PADRÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL, NOS pHs 3,0 , 5,0 E 7,0

As Figuras 4.1 a 4.3 apresentam os gráficos da tensão superficial vs logaritmo da concentração para os pHs 3,0 e 5,0 e 7,0, respectivamente. Utilizou-se a média da tensão superficial do primeiro e segundo ciclo para cálculo da CMC. Uma tabulação completa dos dados se encontra no Apêndice A

A diferença nos valores encontrados para a CMC a pH 3,0 apresentados na Tabela 4.1 e no Gráfico 4.1 pode ser atribuída aos erros experimentais associados a escolha do equipamento e a metodologia usada, como por exemplo. O controle inadequado da temperatura, a presença de espuma nas soluções lidas, a conservação do extrato de quilaia e a retirada prévia de umidade do extrato. O mais provável entretanto, é a influência dos pré-tratamentos sofrido pelo extrato de quilaia o que pode acarretar em hidrólise parcial das saponinas (Ruiz, 1979) ou a formação de artefatos (Ruiz et al, 1995)

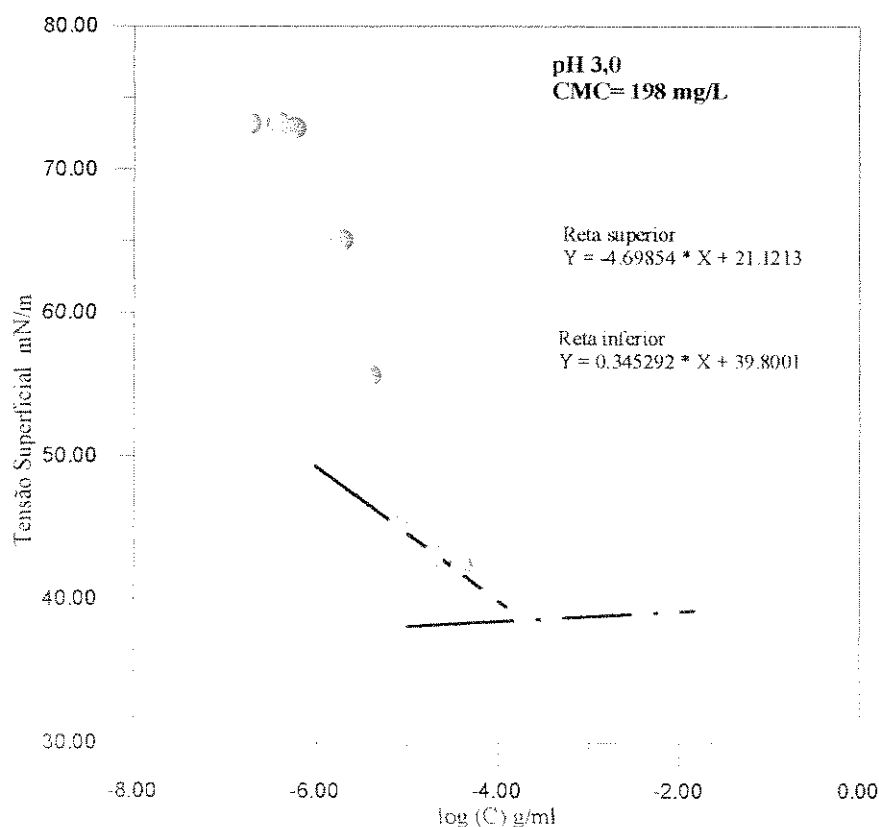


Figura 4.1 Determinação da CMC de extrato de quilaia (desengorduramento brando), a pH 3,0

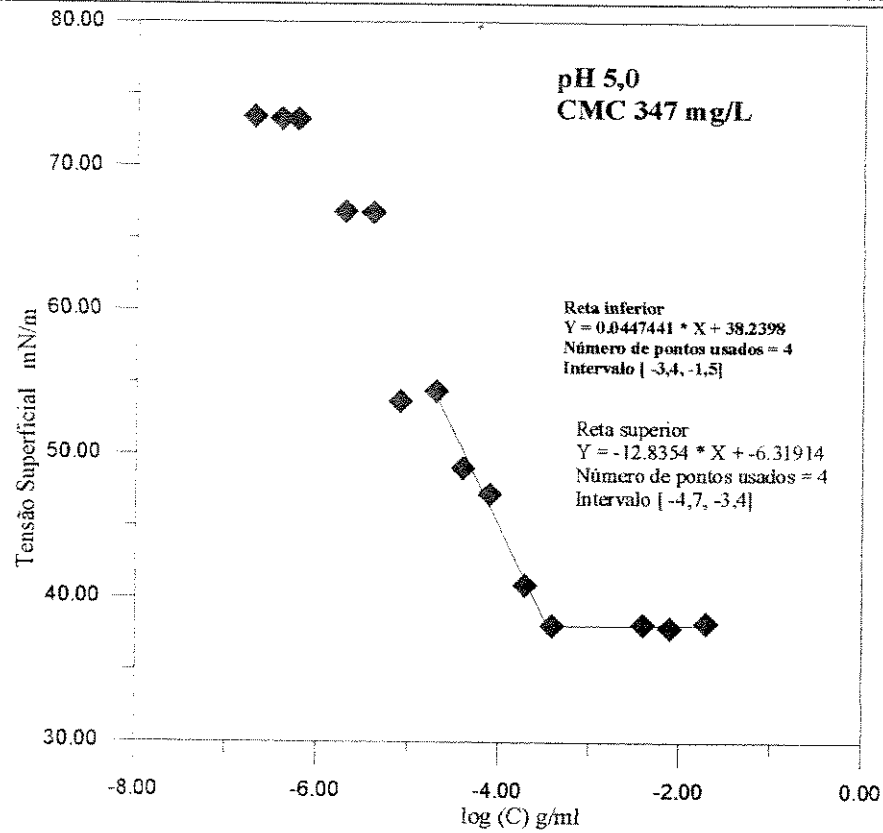


Figura 4.2 Determinação da CMC de extrato de quilaia (desengorduramento brando), a pH 5,0

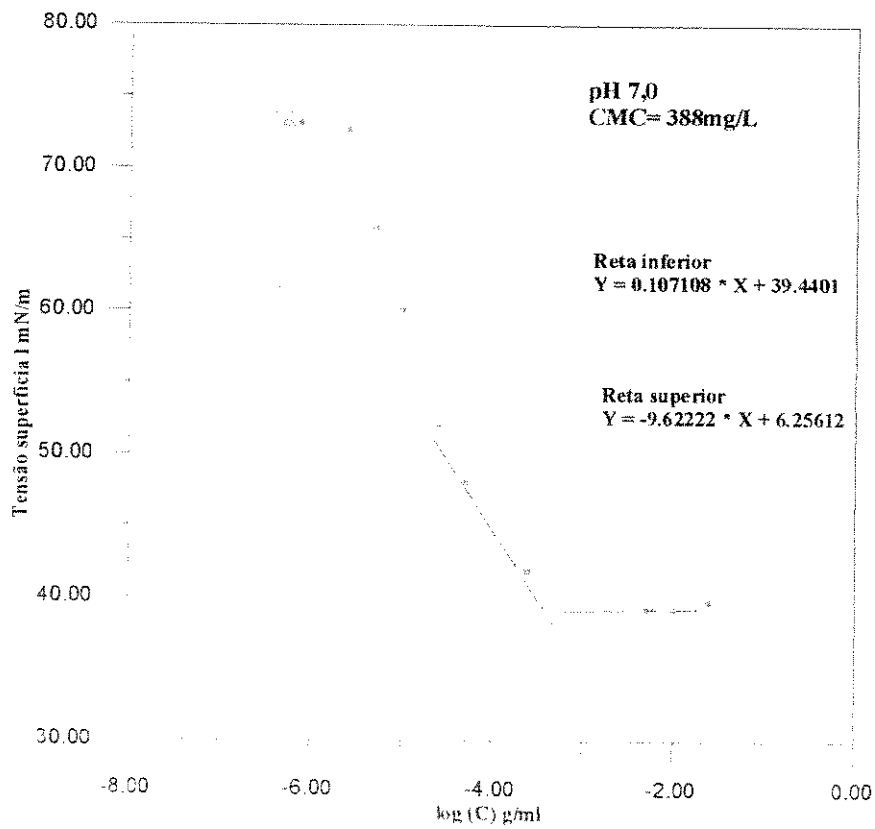


Figura 4.3 Determinação da CMC de extrato de quilaia (desengorduramento brando), a pH 7,0

Como exemplo desse efeito, a Figura 4.4. apresenta os valores da tensão superficial vs concentração para o pH 3,0 e para o pH original da solução, que se situava em torno de 5,50-7,0, obtidos seguindo a metodologia Sundfeld (1995), com o extrato quilaia desengordurado com acetona, em Extrator Soxhlet, por várias horas. Observa-se que os valores obtidos da tensão superficial com desengorduramento à quente são maiores e mais dispersos do que os obtidos com desengorduramento à frio.

Na Tabela 4.2 encontra-se os valores obtidos para a CMC do extrato de quilaia em condições brandas e que serão referências para o presente trabalho; eles são diferentes dos obtidos por Sundfeld (1998) apresentados na Tabela 4.3 nos quais o extrato não sofreu nenhum pré-tratamento inicial.

Sundfeld (1998) avaliou saponinas de quilaia de fabricantes diferentes e concluiu que possuem teores diferentes de sapogenina. Apesar das amostras estudadas nesse trabalho serem do mesmo fornecedor, o lote utilizado foi diferente do utilizado por Sundfeld (1998).

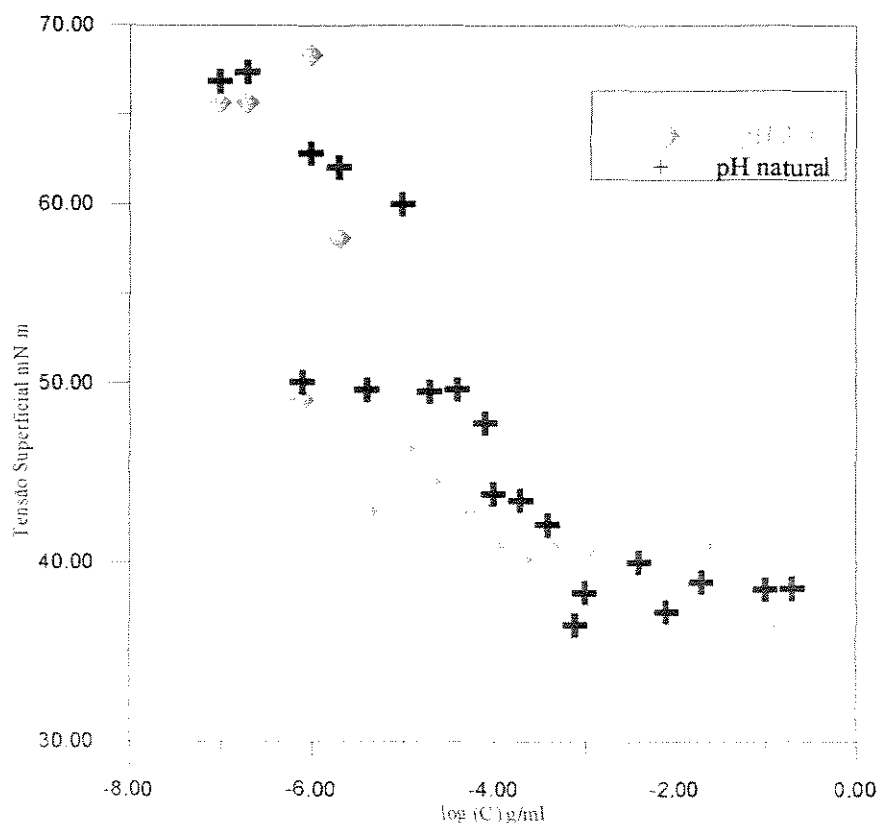


Figura 4.4 Gráfico da Tensão superficial vs concentração de extrato de quilaia (desengorduramento a quente) nos pHs 3,0 e natural.

Tabela 4.2 Valores da Concentração Micelar Crítica obtidos com extrato de quilaia desengordurado em condições brandas

pH	Concentração Micelar Crítica (CMC)		
	mg/L		
	1º Ciclo	2º Ciclo	Média
3,0	175	179	198
5,0	360	353	347
7,0	386	362	388

Tabela 4.3 Valores de CMC obtidos com o extrato de quilaia, sem pré-tratamento (Sundfeld, 1998)

pH	Concentração Micelar Crítica (CMC)		
	mg/L		
	Limite inferior	Limite superior	Média
3,0	59	94	76
4,5	650	800	720
6,0	920	700	810

O decréscimo da CMC com o pH pode ser atribuído a maior facilidade na aproximação das moléculas de saponinas para a formação de agregados miceliares. Fatores que contribuem para o processo de aproximação e agrupamento das moléculas de saponinas em solução contribuem para a diminuição do valor da CMC. As saponinas de quilaia são surfatantes aniônicos devido ao grupo carboxila do ácido glicurônico presente nas moléculas. Com a diminuição do pH, diminui também a proporção destes grupos na forma ionizada, diminuindo a repulsão eletrostática entre moléculas. Assim seria de se esperar que a diminuição favorecesse a formação de micelas e resultasse na diminuição da CMC (Sundfeld,1998).

4.2 ENSAIOS COM FRACIONAMENTO POR ESPUMA

Apresenta-se nesta seção os resultados dos ensaios preliminares com as três versões de coluna de fracionamento e os ensaios com a versão definitiva a três níveis de pH e três níveis de concentração.

4.2.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Versão Tubo de 30 cm

As soluções de quilaia na faixa de 200 a 20000mg/L espumavam abundantemente a aparência da espuma mudava ao longo do tempo de ensaio. Inicialmente formou-se uma espuma que ascendia com facilidade pela coluna. Após um certo tempo, a coluna continua se rompia em bolhas esféricas formando buracos por toda a coluna de espuma, adquirindo um aspecto de rede. Essas bolhas coalesciam em bolhas maiores adquirindo uma forma quase poliédrica, que se fragmentava em várias partes. Quanto mais diluída a solução usada, mais cedo ocorrem essas transformações e com a uma vazão baixa coletava-se uma espuma mais seca e bem drenada.

A medida que se aumentava a concentração de surfatante, as bolhas diminuía de tamanho na espuma. A coalescência começou a diminuir gradualmente de intensidade até que a uma determinada concentração de surfactante cessava a coalêscencia e a coluna de espuma adquiria uma aparência branca devido a grande quantidade de pequenas bolhas de ar contida nela. Ao diminuir-se a concentração para 10mg/L a espuma não apresentou estabilidade suficiente para ser coletada. Observou-se que para uma vazão constante, quanto maior a concentração da solução inicial, menor é o volume de solução residual na coluna. Constatou-se também que uma pressão menor que $1,0 \text{ kgf/cm}^2$ não fornecia uma vazão constante de ar comprimido. Os melhores resultados foram conseguidos a uma pressão de 2 kgf/cm^2 , vazão de 13,60mL/min e concentração de 200mg/L.

Versão II - Tubo de 100cm

• **Volume de solução inicial (Si)**

Baseado nos resultados anteriores, manteve-se uma vazão constante de 13,6 mL/min de ar comprimido.

Foram fracionadas também soluções com concentração inicial de 10mg/mL, 40mg/mL e 80 mg/mL mas a espuma não podia ser coletada porque colapsava dentro da coluna.

Os Ensaios realizados com o tubo de 100 cm encontram-se na Tabela 4.4, seguidos de posterior discussão.

Tabela 4.4 Ensaios realizados com tubo de 100cm para determinação do Vi

Ensaio	Concentração (mg/mL)	Vi (mL)
A1	400	245
A2	800	495
A3	100	245
A4	100	495
A5	800	245

Os Ensaios A1 e A2 forneceram iguais frações de espumas coletadas com consistência parecida a *mousse*, uniforme por toda a coluna de espuma e que se mantinha por horas no coletor sem colapsar.

O Ensaio A2 sustentou maior tempo de fracionamento e teve de ser coletado em dois recipientes.

O Ensaio A3 apresentou espuma seca no coletor e poliédrica na coluna, com boa drenagem.

No Ensaio A4 a espuma colapsou dentro da coluna sendo difícil a coleta.

Escolheu-se para os ensaios seguintes, o menor dos volume (245mL) pois

verificou-se que o aumento da altura de Si não era significativo para o enriquecimento. Como é na coluna de bolhas que ocorre adsorção do soluto na interface, supõem-se que, a partir de uma determinada altura de Vi, já ocorreu saturação da monocamada. Limitando essa altura, haverá um aumento na altura de drenagem que pode levar a coleta de espuma menos úmida e mais enriquecida.

- **Escolha de aditivo**

A concentração de quilaia usada e as quantidades de aditivos utilizadas nos diversos ensaios estão listada na Tabela 4.5. As conclusões observadas são apresentadas abaixo.

A adição de glicerol (Ensaio de B1 a B13) fornece os seguintes resultados:

- * **Ensaio B1:** A espuma apresentou boa mobilidade, ela se fragmentou em várias partes na coluna mas conseguiu ser arrastada e coletada.

- * **Ensaio B2:** A espuma foi recolhida úmida demais.

- * **Ensaio B3 e B5:** A espuma apresentou boa mobilidade para ascensão, mas após se romper na coluna ficou presa no primeiro segmento da coluna.

- * **Ensaio B4:** A espuma teve ascensão rápida demais sem ocorrer a drenagem; a espuma após colapso ficou aderida ao becher.

Para a concentração de 400mg/mL, três gotas de glicerol foram suficientes para fornecer o efeito desejado.

- **Ensaio B6:** Ocorreu maior arraste de líquido em relação aos outros ensaios realizados na mesma concentração. A espuma após colapso ficou aderida ao becher, não sendo analisada por HPLC.

- * **Ensaio B7:** A espuma coletada após colapso ficou aderida ao becher e apresentou pontos pretos.

- * **Ensaio B8:** Não houve formação de espuma com estabilidade suficiente para ser coletada.

- * **Ensaio B9:** A espuma pode ser coletada mas estava muito seca logo na primeira fração recolhida.

Tabela 4.5 Composição das soluções de extrato de Quialia fracionadas (Vi= 235 mL)

Ensaio	Concentração mg/L	gotas
Glicerol		
B1	800	6
B2	400	12
B3	400	6
B4	400	5
B5	400	3
B6	200	6
B7	200	4
B8	100	6
B9	100	4
B10	100	2
B11	80	6
B12	80	3
B13	80	0

Ensaio	Concentração mg/L	gotas
Metil celulose 0,5%		
B14	400	3
B15	400	2
B16	200	8
B17	100	8
B18	100	4
Alginato 1%		
B19	800	3
B20	400	6
B21	400	3
B22	200	4.5
B23	80	18
B24	20	9
B25	20	6

* **Ensaio B10:** Fracionamento com quantidade muito pequena de espuma que aderiu ao coletor após colapso.

* **Ensaio B11 e B12:** Com maior número de gotas de aditivo aumentou-se a mobilidade da espuma mas ambas arrebentaram dentro da coluna, dificultando a coleta da espuma.

* **Ensaio B13:** Pouquíssima espuma foi coletada, menor que nos ensaios B11 e B12.

* **Ensaio B13:** Pouquíssima espuma foi coletada, menor que nos ensaios B11 e B12.

A adição de metil celulose não trouxe vantagens, principalmente para a concentração de 100mg/L onde houve interferência na formação da espuma, conforme se pode concluir dos comentários abaixo.

***Ensaio B14:** O fracionamento produziu menor massa de espuma que o Ensaio B15

* **Ensaio B15:** Foram coletadas cinco frações de espuma sendo que as Frações 4 e 5 ficaram aderidas ao becher. A espuma possuía alta estabilidade e sobrou muita espuma acima de Sr no final do fracionamento

***Ensaio B16:** A espuma não apresentou mobilidade para ser totalmente arrastada da coluna sobrando muita espuma acima de Sr.

***Ensaio B17:** O espumado apresentou flocos gelificados fibrosos. Para solubilização dos flocos adicionou-se acetonitrila, mas não houve solubilização.

***Ensaio B18:** O fracionamento apresentou uma solução residual límpida mas muita espuma ficou aderida à parede da coluna. Observou-se interferência do aditivo na espuma que se apresentou seca mas com aparência de algodão doce. A espuma não foi analisada por HPLC

Os ensaios com alginato indicaram o seguinte:

* **Ensaio B19:** Sobrou bastante espuma acima de Sr e após o colapso a espuma ficou aderida ao becher.

* **Ensaio B20:** O tempo de fracionamento foi longo e a espuma demorou a quebrar na coluna de fracionamento, tendo a aparência muito viscosa. Muito arraste de solução pela espuma.

* **Ensaio B21 :** Sobrou muita espuma acima da Sr no final do fracionamento.

***Ensaio B22 :** Apresentou um bom fracionamento, coletou-se uma espuma úmida em dois frascos. A solução demorou a colapsar e teve comportamento semelhante a espuma obtida a partir de uma solução inicial com concentração de 400mg/L.

***Ensaio B23:** Forneceu quantidade muito pequena de espuma.

* **Ensaio B24:** A espuma não pode ser recuperada da coluna.

***Ensaio B25:** A espuma apresentou boa drenagem deixando a Sr límpida, sem

espuma, mas a espuma ficou presa na parede da coluna, não sendo possível coletá-la pois não tinha estabilidade para ascensão.

O objetivo dos aditivos era aumentar a viscosidade da solução a ser fracionada (S_i), evitando a ruptura das bolhas, mas em alguns ensaios ocorreu também um aumento da viscosidade da espuma produzida (S_e) que chegava a aderir ao becher (coletor) após o colapso.

Dos aditivos testados descartou-se o metil celulose por não conferir uma estabilidade significativa a espuma formada a partir de soluções fracionadas com baixa concentração inicial de S_i e aumentar a estabilidade da espuma coletada obtidas a partir de soluções fracionadas com concentração inicial de S_i alta. Isso aumentava o tempo de colapso que em determinadas situações, necessitava até dois dias e a espuma coletada e não se solubilizavam em acetonitrila.. Concluiu-se, com ajuda da FEA/microbiologia (Selor, 1996) que os pontos pretos presentes nos frascos coletores dos Ensaios 7 e 13 eram fungos. Foi adotado no novo equipamento, a esterilização da vidraria e lavagem da coluna com solução aquosa de ácido clorídrico e construção de uma estufa para colapso da espuma a 40° C, detalhadas no próximo item.

Alginatos forneceram uma boa estabilidade para a espuma aumentando o tempo de fracionamento, mas a espuma coletada era úmida, sem aumento significativo da taxa de drenagem.

O melhor comportamento foi o do glicerol, no caso de solução de aquosa de quilaia na concentração de 400mg/L. Como ele é de baixo custo, foi selecionado como aditivo a ser usado.

♦ Efeito do pH

Os ensaios realizados são apresentados na Tabela 4.6 apresenta-se uma avaliação dos resultados obtidos.

O volume de solução inicial foi mantido em torno de 250ml e o número de gotas de glicerol variava com a concentração conforme pré-determinado nos ensaios (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Efeito do pH no fracionamento por espuma com uma coluna de 100cm

Ensaio	Concentração de Quilaia (mg/L)	pH	Adição de Glicerol (gotas)
C1	800	10	-
C2		10	6
C3		4,0	-
C4		4,0	6
C5	400	10	-
C6		10	4
C7		4,0	-
C8		4,0	4
C9	200	3,0	-
C10		3,0	3
C11	800	3,0	-
C12		3,0	6
C13	400	3,0	-
C14		3,0	3
C15	100	3,0	-
C16		3,0	2

A solução Si após adição de NaOH, para redução do pH, adquiriu coloração verde

Os Ensaio C1 e C2, independente da adição de glicerol, produziram uma espuma com alto teor de líquido.

O Ensaio C3 sustentou 6 horas de fracionamento e o C4, 5 horas. No Ensaio

C3 a espuma quebrou ainda úmida dentro da coluna e sobrou bastante espuma acima da Sr. No Ensaio C4 sobrou pouca espuma acima da Sr no final do fracionamento.

Os ensaios de C1 – C6 apresentaram a última fração de espuma seca mas após o colapso a espuma ficou aderida ao coletor, dando a falsa impressão de um coletor limpo, sem espumado. As frações de espuma dos Ensaios C2 e C4, após a diluição do espumado em acetonitrila para injeção em HPLC, apresentaram turvação ou precipitado em forma de floco.

Acredita-se que em pH 10 a presença de íons OH^- na solução, que são favoráveis a formação de ligações peptídicas segundo Berkman e Egloff (1934), levem a formação de interferentes ou interferentes são arrastados com a espuma, proporcionando a aderência do espumado ao coletor de vidro.

Nos Ensaios C9 e C10 a operação de fracionamento durou 1 h 30 min. Na concentração, 200 mg/L, a solução com glicerol apresentou uma espuma seca e bem drenada, e menor quantidade de espuma foi recolhida em relação à solução sem glicerol.

Os Ensaios C11 e C12 forneceram uma espuma úmida, sem ocorrência significativa da drenagem.

Os Ensaios C13 e C14 necessitaram de mais de 24 horas para colapso da espuma que após colapsada, apresentaram fungos.

O ensaio realizado com $\text{Si}=100\text{mg/mL}$ sem adição de glicerol não pode ser coletado, porque a espuma arrebitou na coluna de fracionamento.

A variação do pH da solução inicial é mais significativa a baixas concentrações desta solução. Com a redução do pH e da concentração obteve-se espumas mais drenadas e secas. Acredita-se que seja devido a presença de grupos ionizáveis que poderiam se associar com o glicerol através de ligações intermoleculares, como pontes de hidrogênio, sendo estas ligações fortemente influenciadas pelo pH do meio.

A adição do glicerol levou a formação de espumas extremamente secas, influenciando o volume final de espumado devido a aderência da espuma ao coletor. O glicerol pode ter removido a saponina da superfície das bolhas diminuindo a espumabilidade do sistema. O tempo de colapso aumentou em alguns ensaios, ocasionando a formação de pontos pretos (fungos) ou turvação e precipitação com

adição de acetonitrila na espuma colapsada. Por isso descartou-se o uso de glicerol nos ensaios subsequentes, utilizando-se como alternativa para produção de espumas secas e bem drenadas o aumento da altura da coluna de fracionamento (Santana, 1995 e Miguel, 1996).

Versão III- Tubo de 175 cm

Aumentou-se a altura da coluna de vidro para explorar mais a operação de fracionamento, já que os resultados iniciais recomendaram trabalhar com soluções mais diluídas (abaixo da CMC) e com espumas bem drenadas mantendo-se uma vazão amena de gás de arraste. Aumentando-se a coluna de líquido e com uma adequação da vazão de gás, aumenta-se o tempo de residência das bolhas na coluna sem que a drenagem rompa a espuma (Miguel, 1996) com a vantagem de se evitar o uso de aditivos que produzem uma espuma úmida ou seca com a presença de interferentes.

Avaliação do volume de Si

Observou-se um declínio da massa de líquido arrastada pela espuma com o tempo. As frações intermediárias de espuma tinham massa semelhante, repetindo-se o efeito citado descrito por Miguel (1987) na revisão da literatura. Quanto maior a altura de Si maior a quantidade de massa de espuma úmida recolhida. Com a redução do volume da solução inicial recolhia-se uma quantidade menor e mais drenada de espuma, mas sobrava muita espuma aderida a parede da coluna sendo necessário raspar a parede interna da coluna para coleta-la. A massa total das frações de espuma de cada ensaio é apresentada na Tabela 4.7

Tabela 4.7 Ensaio realizados com tubo de 175 cm para avaliação da influência do volume inicial de Si.

Concentração de Si= 400mg/L		
Ensaio	Volume de Si	Massa total das frações de espuma coletada
D1	750	64,77
D2	500	34,71
D3	380	25,58
D4	300	16,63

- **Variação da altura da coluna de espuma**

Os ensaios são detalhados na Tabela 4.8

Tabela 4.8 Variação da altura da coluna de fracionamento, solução de 400mg/L a pH 3,0

Ensaio	Altura da coluna de fracionamento cm	Massa de espuma
E1	175	10,85
E2	135	14,40

Para o pH 3,0 foi observado que quanto maior a altura da coluna menor a massa de espuma coletada. Com uma coluna de altura maior houve necessidade se raspar a parede da coluna para recolher a espuma aderida e com uma altura menor de coluna de fracionamento a espuma ficou presa apenas no coletor.

Baseado nos Ensaio preliminares para os ensaios definitivos algumas medidas foram tomadas.

- A coluna da Versão II e III era dotada de juntas esmerilhadas que poderiam estar criando zonas de restrições ao escoamento ocorrendo o aumento da drenagem e rompimento da espuma nesta área. Elas foram substituídas por juntas de PVC, de maneira a se manter o mesmo diâmetro interno ao longo da coluna.
- Os ensaios definitivos foram realizados antes, após e na CMC e a três pHs. Como foi verificado que a pH 3,0 e concentração de Si acima da CMC, uma maior altura da coluna de bolhas favorece a recuperação de tensoativos. Será utilizado uma grande altura de Si para garantir a concentração na superfície da bolhas dos tensoativos presentes em Si e diminuir a altura da coluna de espuma reduzindo os efeitos de ruptura das bolhas, sendo usada uma vazão um pouco maior que nos ensaios preliminares para permitir que ocorra a drenagem e a coleta da espuma.
- Pela metodologia de peso seco que será adotada para quantificar a espuma, que exige uma grande massa de espuma, não foi possível trabalhar com frações de espuma e sim com a mistura de todas as frações de espuma (espumado), isto é, não se procedeu a um fracionamento em coluna, mas a uma separação da espuma.

4.2.2 SOLUÇÃO AQUOSA DE QUILAIA EM pH 3,0

Os primeiros ensaios com a versão definitiva da coluna de espuma visavam determinar a mínima concentração de extrato de quilaia que produzia uma espuma removível, assim como a menor altura de coluna de líquido que permitia realizar o fracionamento por espuma.

Esses ensaios exploratórios indicaram que a menor concentração de extrato na Solução Inicial (Si) factível era 80mg/L para uma altura de coluna de líquido entre 152-159 cm.. Abaixo dessa concentração não havia formação de uma espuma estável que pudesse ser coletada . Embora todos os ensaios realizados com a Versão II e III fossem feitos com uma vazão de nitrogênio de 13,60 mL/min, preferiu-se aumentá-la para 22,60 mL/min, por ser a vazão utilizada no final do processo, ao empurrar a espuma residual final da coluna, sem colapsar .

As concentrações da Solução Inicial usadas foram 80 mg/L, 200mg/L e 800mg/L que correspondem, respectivamente a um valor abaixo da CMC, na região da CMC e acima da CMC, para o pH 3,0.

Os ensaios são apresentados listando-se as variáveis operacionais: a concentração de Si, pH de Si, altura de coluna de líquido e vazão de nitrogênio. Também se apresenta a CMC do extrato de quilaia no pH do ensaio apresentada em 4.1.

Ensaio 1		
Si= 80mg/l	pH3,0	CMC = 198 mg/L
Altura de Si: 154 cm Vazão de N ₂ : 22,60 mL/min		

Foi necessário realizar dois fracionamentos nas mesmas condições, denominadas de A e B, para coletar material suficiente para as análises. O espumado foi recolhido no mesmo becher. A Tabela 4.9 apresenta as quantidades envolvidas. O pH da espuma colapsada foi 2,75.

Tabela 4.9 Dados do Fracionamento do Ensaio 1

Operação	Tempo de Fracionamento Horas	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
Fracionamento A	1h 45 min	953,47	931,81	16,37
Fracionamento B	1h 50min	953,47	904,72	24,76
			TOTAL	41,13

Apesar de se ter tentado reproduzir exatamente as mesmas condições de operação, observa-se que a massa de espuma coletada no Fracionamento B foi 50% superior a do Fracionamento A.

- **Monitoriamento pela massa seca**

O peso seco final, das amostras evaporadas, neste ensaio, foi determinado em estufa á vácuo a 60° C durante 12h. O produto final de evaporação em banho-maria, das soluções Se e Sr tinham uma cor verde musgo, enquanto Si apresentou coloração amarelada.

Os valores de massa seca encontrados e as concentrações de Si, Sr e Se calculados a partir dos dados da Tabela 4.9 estão na Tabela 4.10. A espuma apresentou 35,7 mg de

Uma análise dos valores da Tabela 4.10 indica que a determinação do peso seco não deve ter sido bem conduzida pois há uma discrepância entre a massa calculada da Solução Inicial (182,20mg) e a soma das massas das frações resultantes (157 mg). Essa conclusão é reforçada pelo fato de se ter consumido apenas 152,56 mg do extrato seco de quilaia na confecção do volume (1907 mL) de Solução Inicial e indica que a determinação do peso seco da Solução Inicial não foi completa. Essas diferenças resultam do fato de se trabalhar com soluções muito diluídas de material higroscópio.

Tabela 4.10 Massas e concentrações em sólidos secos do Ensaio 1 (A e B)

Solução	Massa seca (mg)	Concentração (mg/L)
Inicial (A+B)	182,20	95,10
Resíduo A	58,90	63,20
Resíduo B	62,40	69,00
Espumado (A + B)	35,70	868,00

Uma análise dos valores da Tabela 4.10 indica que a determinação do peso seco não deve ter sido bem conduzida pois há uma discrepância entre a massa calculada da Solução Inicial (182,20mg) e a soma das massas das frações resultantes (157 mg). Essa conclusão é reforçada pelo fato de se ter consumido apenas 152,56 mg do extrato seco de quilaia na confecção do volume (1907 mL) de Solução Inicial e indica que a determinação do peso seco da Solução Inicial não foi completa. Essas diferenças resultam do fato de se trabalhar com soluções muito diluídas de material higroscópio.

Os dados da Tabela 4.9 indicam que houve uma redução de volumes da ordem de 46 entre a solução inicial e o espumado. O resultado mais importante diz respeito a purificação, e pode ser extraído da Tabela 4.9. Considerando como referência a massa seca total proveniente das frações (157 mg) e que o resíduo não apresentou mais atividade espumante, conclui-se que 121,30 mg de componentes sem atividade de superfície foram separados da mesma. O espumado isolou 35,7 de compostos tensoativos que certamente incluem a pequena quantidade de proteína presente e que podem ter arrastados outros componentes O espumado retirou 23% dos sólidos do extrato, sendo que esse valor é próximo do conteúdo estimado de saponinas existentes no mesmo. Esse é mais um índice da eficiência do processo.

Enriquecimento por massa seca

Calculado pela Equação (3.3) do Capítulo 3

$E_{ms} (g) = M(Se)/V_e / M(Si)/V_{si} = 10,85$



O aumento na concentração de tensoativos na espuma em relação a concentração inicial de quilaia foi de cerca de 10 vezes para o fracionamento com espuma da solução aquosa de quilaia com concentração inicial de 80 mg/L e pH 3,0.

Ensaio 2
Si= 80mg/l pH3,0 CMC = 198 mg/L
Altura de Si: 152,80 cm Vazão de N ₂ : 22,60 mL/min

O Ensaio 2, que repetiu as condições do Ensaio 1, apresentou um espumado com baixa quantidade de líquido sendo a última fração de espuma era seca e bem drenada. Os resultados são apresentados na Tabela 4.11. Observa-se que o volume de espumado foi próximo ao obtido no Ensaio 1B.

As frações de espuma colapsada tiveram seu pH aferido com pHmetro quando possível. No caso de frações de espuma de volume muito pequeno, o pH foi lido com papel tornassol. Os resultados encontram-se na Tabela 4.12.

Tabela 4.11 Dados do fracionamento do Ensaio 2

Tempo de fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
2	947,6	922,80	29,79

Tabela 4.12 pH das soluções do Ensaio 2

Solução	pH
Resíduo	3,06
Inicial	3,00
Espumado	2,90

• Monitoramento pela tensão superficial

Para a determinação da tensão superficial foram utilizadas cubetas pequenas de 4,40 cm diâmetro e 2,80 cm de altura, com um volume de 15mL.de solução. Os valores obtidos estão na Tabela 4.13.

Os dados confirmam o esgotamento da solução residual final, pois sua tensão superficial está próxima à da água desionizada. Acredita-se que o uso de uma alta vazão de nitrogênio no final do fracionamento para expulsar a espuma acima da solução residual permitiu a coleta de Sr isento de espuma e fornecendo um alto valor para a tensão superficial.

Tabela 4.13 Tensão Superficial do Resíduo, da Solução inicial, e do Espumado, Ensaio 2

Solução	Tensão superficial		
	(mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
Água desionizada	73,77	—	73,77
Si	43,79	42,90	42,99
Sr	73,16	73,51	73,34
Se	41,08	40,80	40,94

A tensão superficial da espuma também está próxima a da solução inicial, mas na região assintótica, junto a CMC, o que significa que pode haver considerável variação de concentração.

Assumindo-se como referência de concentração, o valor de 868 mg/L obtido no Ensaio 1 levantou-se uma curva de tensão superficial vs logaritmo da concentração da espuma.

As leituras nas diferentes concentrações foram obtidas por diluições sucessivas conforme explicitado na Seção 3.2.5.4. Os resultados obtidos estão na Tabela 4.14 e na Figura 4.5

O espumado precisou ser diluído mais que 11 vezes para ter uma tensão próxima à da água (73,77 mN/m) e do resíduo

Em relação a solução Si o espumado precisou ser diluído 4 vezes para chegar a tensão superficial da solução inicial, o que significa que os tensoativos estão 4 vezes mais concentrados na espuma do que na alimentação. Esse resultado mostra uma concordância satisfatória com a relação obtida através do peso seco, que indicava que 23% da massa seca inicial tinha sido transferida para a espuma.

A Figura 4.6 faz uma comparação das curvas da tensão superficial vs logaritmo da concentração entre o extrato de Quilaia (Figura 4.1) e o espumado (Figura 4.5). Para facilitar a comparação, a concentração do espumado da Tabela 4.14 foi dividida por 4.

Caso as duas curvas fossem coincidentes, poder-se-ia se concluir que todos os tensoativos (cerca de 25% do extrato original) haviam sido removidos pela espuma e que além disso, os outros solutos não exerceriam influência sobre essa tensão superficial.

A concordância entre as duas curvas é notável e constitui outro indício de uma eficiente separação. Os desvios apresentados, sobretudo os na região mais diluída, certamente podem ser atribuídos ao efeito dos outros solutos presentes no extrato original.

A relação obtida entre a tensão superficial e a massa seca não se repetiu com os valores obtidos para a CMC.

A CMC do espumado foi de 91,53 mg/L (Figura 4.5), enquanto que a da solução inicial era de 198 mg/L (Figura 4.1). Se os solutos com atividade tensoativas

correspondessem a 25% dessa concentração, ter-se-ia uma CMC do espumado de 49,50 mg/L, isto é quase metade do valor encontrado. Conclui-se portanto, que uma pequena quantidade inerte pode ter sido arrastado pela espuma.

É preciso considerar entretanto que a determinação da CMC é fortemente influenciada pela melhor reta traçada que por sua vez é fortemente influenciada pela precisão dos dados obtidos que estão diretamente relacionados com o grau de purificação e a agregação das moléculas tensoativas presentes no espumado e no extrato de quilaia.

Tabela 4.14 Variação da tensão superficial do espumado com a diluição

(Ensaio 2)

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
868,0	40,74	40,71	40,73
431,0	41,18	40,51	40,85
215,5	41,79	41,31	41,55
107,7	41,47	40,84	41,16
53,87	43,63	43,34	43,49
26,94	46,75	—	46,75
13,47	48,52	—	48,52
6,730	51,67	—	51,67
3,380	60,74	—	60,74
1,680	65,93	65,95	65,94
0,840	70,47	—	70,47
0,420	72,96	72,40	72,68

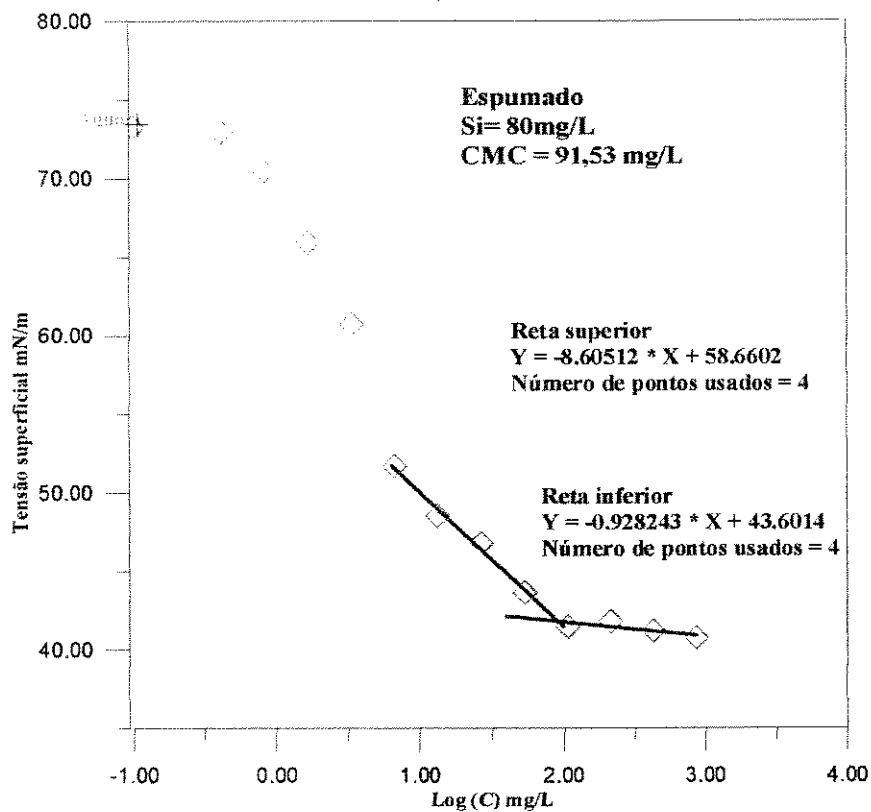


Figura 4.5 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio2

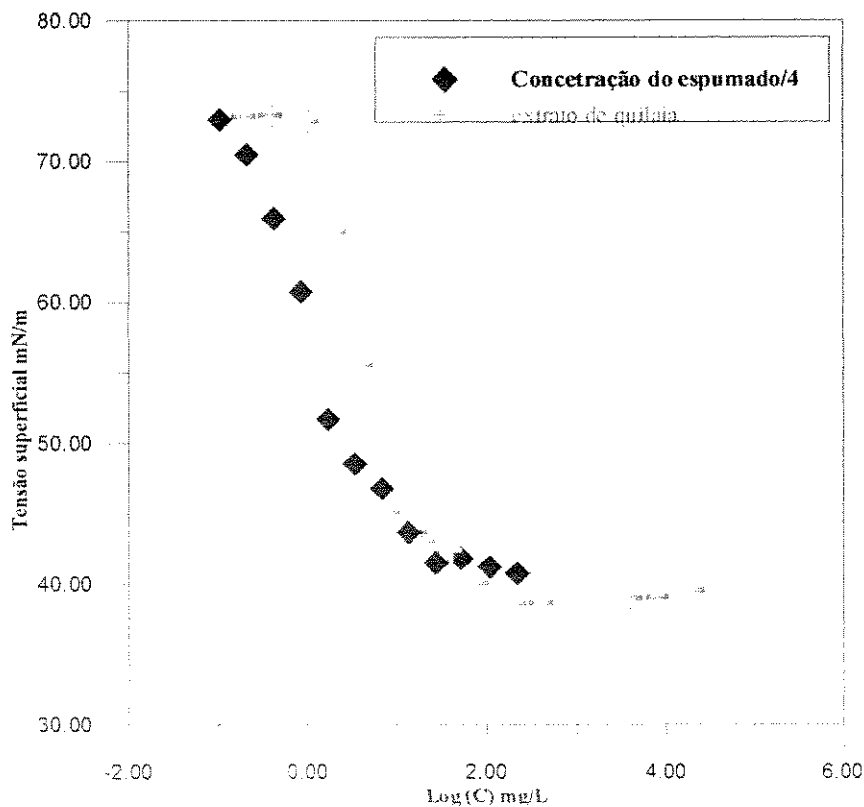


Figura 4.6 Curva da Tensão superficial vs log (C) para o Espumado e para soluções de extrato de Quilaia a pH 3,0

- Monitoramento pela absorbância

As saponinas de quilaia apresentam picos de absorbância entre 205 e 220 nm uma região do UV de baixa especificidade e sujeita a interferência de vários componentes (Kensil et al. 1991, Behboudi et al. 1995).

Os valores de absorbância foram lidos usando como branco, água deionizada e quando a leitura da absorbância na faixa de interesse, [240-190] nm, era maior que 0.8 ua procedia-se as diluições. Estes valores estão plotados nas Figuras 4.7 a 4.11. Nessas figuras, a absorbância e as áreas das soluções diluídas encontram-se corrigidas pelo fator de diluição. Os valores médios da áreas sob a curva Absorbância vs comprimento de onda, calculados pela Regra do Trapézio, entre 190 e 240nm estão na Tabela 4.15

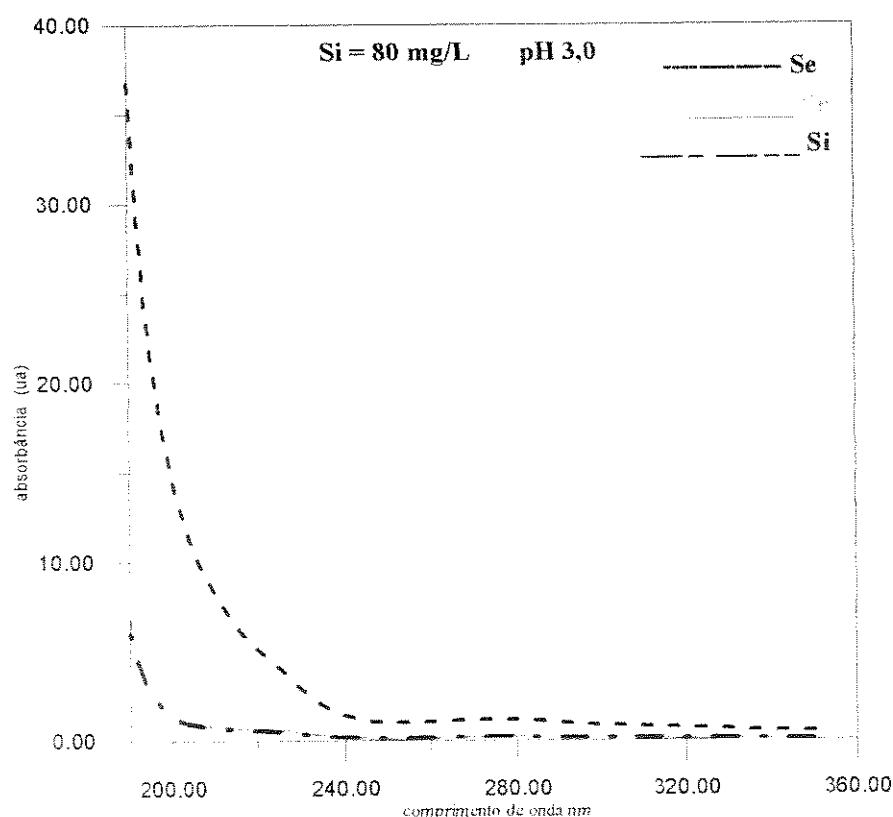


Figura 4.7 Curva de absorbância das soluções do Ensaio 2

Tabela 4.15 Áreas (Absorbância vs comprimento de onda) de adsorção das soluções (Ensaio2)

Solução	Área média
	(240-190 nm)
Se	504,80
Si	61,2
Sr	72,10

As curvas de absorbância do espumado obtidas deixam claro um aumento da absorbância em relação a solução inicial na região de comprimento de onda em torno de 200nm.

Um resultado destoante, entretanto diz respeito a absorbância da solução residual que apresentou valores maiores do que os da solução inicial, e repetiu-se em outros ensaios. Esse resultado é ainda mais contraditório pois se constatou que sem as diluições necessárias para efetuar leituras precisas, a absorbância da solução residual é definitivamente menor do que a solução inicial. Aparentemente, portanto, o processo de diluição libera interferentes, ou seja dissocia alguns agregados.

Baseado nos resultados encontrados pode-se supor que o resíduo concentra substâncias não-tensoativas de baixo peso molecular e com maior afinidade pela água. A diluição desta solução leva a absorbâncias maiores que as da solução inicial e menores que a do espumado.

Uma razão entre as áreas calculadas para a espuma e solução inicial fornece o valor de 8,25. Esse valor é baixo considerando os resultados obtidos no Ensaio 1. Assumindo que a massa seca extraída no espumado seja somente saponina, ter-se-ia uma concentração de 868 mg/L (ver Tabela 4.10). Essa mesma massa (35,7 mg), diluída na solução inicial, correspondia a 18,7 mg/L. A razão entre as absorbâncias deveria ser portanto da ordem de 46. Essa grande diferença encontrada, não é explicável por desvios na suposição acima, e provavelmente é devido a não-linearidade nos sinais na região do UV, dado ao alto nível de ruídos, próximo ao extremo do comprimento de onda do aparelho [190- 200nm], e que deveriam ser eliminados (Skoog e Leary, 1992).

Os altos valores lidos de absorbância na Sr podem estar associados a concentração de impurezas ocasionando um desvio a Lei de Beer, e também influenciados por esses ruídos.

Não parece ser possível portanto, obter estimativas quantitativas do grau de purificação por comparação dos valores da absorbância. As curvas de absorbância porem são úteis para confirmar as tendências de concentração na região em torno de 200- 220 nm.

Ensaio3		
Si= 200mg/l	pH3,0	CMC = 198mg/L
Altura de Si: (Ha = 149,09 cm e Hb = 150,25 cm)		
Vazão de N ₂ : 22,60 mL/min		

Foram realizados dois fracionamentos com a mesma Si (A e B) , mas coletados em um mesmo becher. Os volumes obtidos estão na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 Dados do fracionamento do Ensaio 3

Operação	Tempo de Fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
Fracionamento A	4	924,64	893,02	
Fracionamento B	6,30	931,81	896,13	
			TOTAL	50,51

Apesar de se coletar uma espuma com uma aparência compactada e uniforme enchendo todo o coletor, a massa da espuma foi semelhante da coletada nos Ensaio 1 e 2. Observa-se que o tempo de processo foi duas a três vezes maior do que o do Ensaio 1, sendo proporcional ao aumento da concentração de extrato. O pH das soluções envolvidas no fracionamento está apresentado na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 pH das soluções do Ensaio 3

Ensaio 2		
Operação	Solução	pH
Fracionamento A	Residual	2,80
Fracionamento B	Residual	2,95
Fracionamento (A e B)	Inicial	3,00
Fracionamento (A+B)	Espuma	2,53

• Monitoramento pela massa seca

A Tabela 4.18 apresenta os valores da massa seca obtido após evaporação, em Banho Maria e secagem em estufa.

Tabela 4. 18 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio 3 (A e B)

Soluções	Massa seca (mg)	Concentrações (mg/L)
Iniciais	439	236,0
Resíduo	279	156,0
Espumado	97,3	1926

As mesmas dificuldades de análise observadas no Ensaio 1 se repetem nesse Ensaio 3. O valor encontrado para a massa seca da solução inicial é muito maior do que

a massa de quilaia usada (372mg), que por sua vez, é próximo a soma da massa seca do resíduo e da espuma (376mg).

A redução de volume da alimentação para o espumado foi 36,7, menor do que no ensaio com 80mg/L (Ensaio 1). A porcentagem da massa da solução inicial transferida para a espuma foi 25,8%. Esse valor é próximo ao do Ensaio 1 e do conteúdo estimado de saponina do extrato. Não é possível concluir se a maior massa de sólidos extraídos corresponde a saponinas ou a arraste de solutos sem atividade superficial.

- **Enriquecimento por massa seca**

Ems = 9,63

O aumento na concentração de tensoativos na espuma em relação a concentração inicial de quilaia foi de cerca de nove vezes para o fracionamento com espuma da solução aquosa de quilaia com concentração inicial de 200 mg/L e pH 3,0.

Ensaio 4		
Si= 200mg/l	pH3,0	CMC = 198 mg/L
Altura de Si: (H =157,8 cm)		Vazão de N ₂ : 22,60 mL/min

Esse ensaio complementa o Ensaio 3, e foi usado para avaliar a operação em termos da tensão superficial e absorção. Na Tabela 4.19 tem-se os volumes envolvidos e na Tabela 4.20, os pHs lidos que se manteve em torno de 3,0. As frações de espuma coletadas eram bastante úmidas indicando arraste de solução. No final do fracionamento constatou-se a presença de espuma acima da Sr. Observa-se, pela Tabela 4.19, que a massa de espumado no Ensaio 4 foi cerca de 80% maior do que a do Ensaio 3 de mesmas condições de operação. O tempo de fracionamento do Ensaio 3A foi igual ao do Ensaio 4. Essas variações indicam que o regime de operação, com a solução inicial a 200mg/L, está no limite de estabilidade.

Tabela 4.19 Dados do fracionamento do Ensaio 4

Tempo de Fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa de Espuma (g)
4	978,61	932,72	90,95

Tabela 4.20 pH das soluções do Ensaio 4

Solução	pH
Sr	3,00
Si	3,00
Se	2,92

As leituras da tensão superficial foram realizadas em cubetas de 4,5 cm diâmetro e 3,5 cm de altura com um volume de 50ml de solução e estão na Tabela 4.21. A sequência de leituras, com diluição, estão na Tabela 4.22 e Figura 4.8.

Os valores encontrados para a tensão superficial das soluções do Ensaio 3 são próximos aos encontrados para o Ensaio 1. Um resultado imediato que se tira da Tabela 4.22 é que a solução residual se esgotou em tensoativos, pois sua tensão superficial se manteve próxima à tensão superficial da água,

Tabela 4.21 Tensão Superficial do Resíduo, da Solução inicial e do Espumado, Ensaio 4

Solução	Tensão Superficial (mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
Água desionizada	73,50	—	73,50
Sr	73,04	73,47	73,26
Si	42,50	42,34	42,42
Se	39,89	40,00	39,95

O espumado precisou ser diluído mais que 12 vezes para ter uma tensão próxima à da água e do resíduo. Esses valores são animadores. Em termos de CMC entretanto essas relações indicam que com uma solução inicial próxima a CMC, a eficiência de purificação da coluna é menor da que a concentrações mais baixas.

A Figura 4.8 indica que a CMC do espumado é maior que a CMC do extrato de quercus. Em outras palavras, o espumado, rico em saponinas, deve ter arrastado uma quantidade de inerte e micelas.

Tabela 4.22 Variação da tensão superficial do espumado com a diluição (Ensaio 4)

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
	1º ciclo	2º ciclo	Média
1926	39,97	39,67	39,88
963,0	40,29	39,76	40,02
481,5	40,62	40,08	40,35
240,7	41,59	40,84	41,21
120,3	42,91	41,16	42,05
60,19	45,39	44,42	44,91
30,09	47,03	46,34	46,68
15,05	48,73	48,62	48,67
7,520	55,80	54,60	55,20
3,760	59,43	58,91	59,17
1,880	69,67	68,94	69,30
0,940	71,70	71,56	71,63
0,470	72,64	72,62	72,23

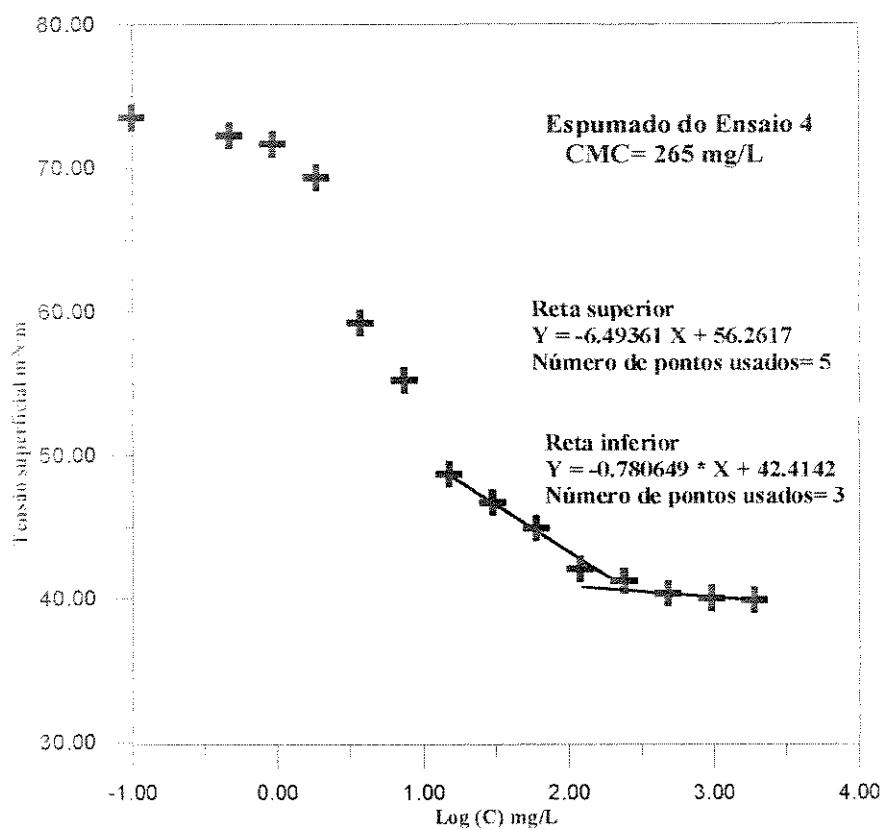


Figura 4.8 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio 4

• Monitoramento pela absorbância

As curvas de absorbância obtidas com os produtos do Ensaio 4 lidas após diluição estão na Figura 4.9. Os valores das áreas calculadas entre 190-240 nm estão na Tabela 4.23, e como no Ensaio 2, observa-se que o aumento de absorbância não condiz com estimativas de enriquecimento da concentração de saponinas. Da mesma maneira que nos ensaios com 80 mg/L, a absorção da solução residual foi maior do que a da solução inicial, embora, no produto não diluído aconteceu o contrário

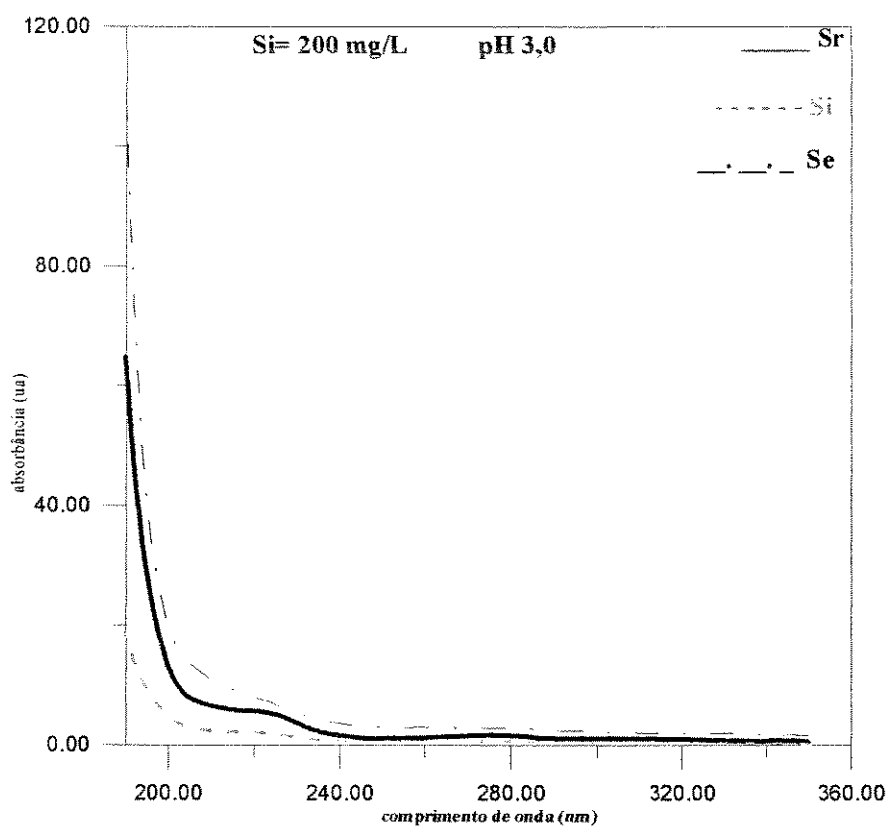


Figura 4. 9 Curva de absorbância das soluções do Ensaio4

Tabela 4.23 Áreas (Absorbância vs comprimento de onda) de adsorção das soluções do Ensaio 4

Solução	Área (média)
	(240-190 nm)
Se	1010
Si	199,1
Sr	621,2

Ensaio 5		
Si= 800mg/L	pH3,0	CMC = 198mg/L
Altura de Si: (H = 152,58 cm) Vazão de N ₂ : 22,60 mL/min		

Foi realizado apenas um fracionamento que forneceu material suficiente para todas as análises, recolhidos em becheres diferentes.

Para esta concentração acima da CMC uma grande quantidade de líquido é arrastada junto com a espuma recolhida, diminuindo a eficiência do processo de concentração e purificação.

A Tabela 4.24 apresenta os dados do fracionamento e os pHs obtidos estão na Tabela 4.25. Os valores da Tabela 4.24 indicam um grande tempo de operação com uma enorme produção de espumado recolhidos em becheres diferentes. Os valores da Tabela 4.20 apresentaram a menor variação de pH entre as soluções de todas as concentrações de Si estudadas para o pH 3,0.

Tabela 4.24 Dados do fracionamento do Ensaio 5

Tempo de fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
7	947,60	431,01	423,53

Tabela 4.25 pH das soluções do Ensaio 5

Solução	pH
Sr	3,01
Se	3,0
Si	2,96

- **Monitoramento pela Massa Seca**

O espumado evaporado foi a combinação de todas as frações de espuma.

Durante a evaporação em Banho-Maria, as soluções apresentaram um aspecto de emulsão óleo em água e coloração bem amarelada. O espumado continha acúmulos de formas enoveladas com aparência de grãos, durante a evaporação. As três fases apresentaram grande quantidade de resíduo preto no final da evaporação em Banho Maria.

As massas secas obtidas, assim como as concentrações nas diferentes frações estão na Tabela 4.26

Tabela 4.26 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio 5

Soluções	Massa seca (mg)	Concentrações (mg/L)
Inicial	725,8	756
Resíduo	229,9	533
Espumado	399,4	943

Ao contrário dos Ensaios 1 e 3 o valor obtido na evaporação da solução inicial foi muito próximo da massa de quilaia utilizada (758 mg), havendo uma diferença considerável entre a massa seca da alimentação e a soma das massas no resíduo e no

espumado. Este fato pode ser explicado pela perda do material na coluna, conforme balanço final (Tabela 4.24).

Esses dados deixam claro que a eficiência na extração de tensoativos no Ensaio 5 é muito baixa, ou mesmo inexistente, pois o grande volume de espuma produzido deve ter arrastado a solução inicial com a presença de micela, sem um efeito de enriquecimento. Confirma-se que o uso de coluna de fracionamento com soluções de concentrações acima da CMC não é aconselhável (Rubin e Garden, 1962).

- **Enriquecimento por massa seca, Ems**

$$Ems(a) = 1,18$$

- **Monitoriamento pela Tensão Superficial**

As medidas da tensão superficial foram tomadas em cubetas de 6,65 cm de diâmetro e 3,75 de altura com 50 ml de solução. Os valores obtidos estão na Tabela 4.27

Tabela 4.27 Tensão Superficial do Resíduo, Solução Inicial e frações de espuma, Ensaio 5

Solução	Tensão Superficial		
	(mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
água desionizada	73,57	—	73,57
Si	40,69	40,21	40,45
Sr	64,08	65,01	64,54
Se	39,69	39,25	39,47

A solução residual tem uma tensão superficial inferior porém próxima a da água pura, indicando que não foi esgotada dos tensoativos.

As diluições do espumado ofereceram tensões superficiais que estão na Tabela 4.28 e plotadas na Figura 4.10. Para construção da curva da tensão superficial do espumado vs concentração da espuma e cálculo da CMC foram utilizados os valores médios da tensão superficial o perfil da curva obtida se aproxima bastante das curvas clássicas deste tipo. O valor da CMC obtido se aproxima da solução original de quilaia, confirmando a baixa capacidade de enriquecimento do sistema, a concentrações acima da CMC.

**Tabela 4.28 Variação da Tensão Superficial do Espumado com a diluição
(Ensaio 5)**

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
943,1	39,16	39,67	39,415
471,5	40,43	40,41	40,42
235,7	40,08	40,15	40,11
117,9	41,23	41,06	41,14
58,94	43,46	43,39	43,42
29,47	46,63	46,55	46,59
14,73	47,70	48,19	47,94
7,370	50,29	50,53	50,41
3,680	53,34	53,23	53,28
1,840	56,03	56,71	56,37
0,920	59,73	59,60	59,66
0,460	61,27	61,37	61,32
0,230	64,21	67,55	65,88
0,11	69,49	70,74	70,11

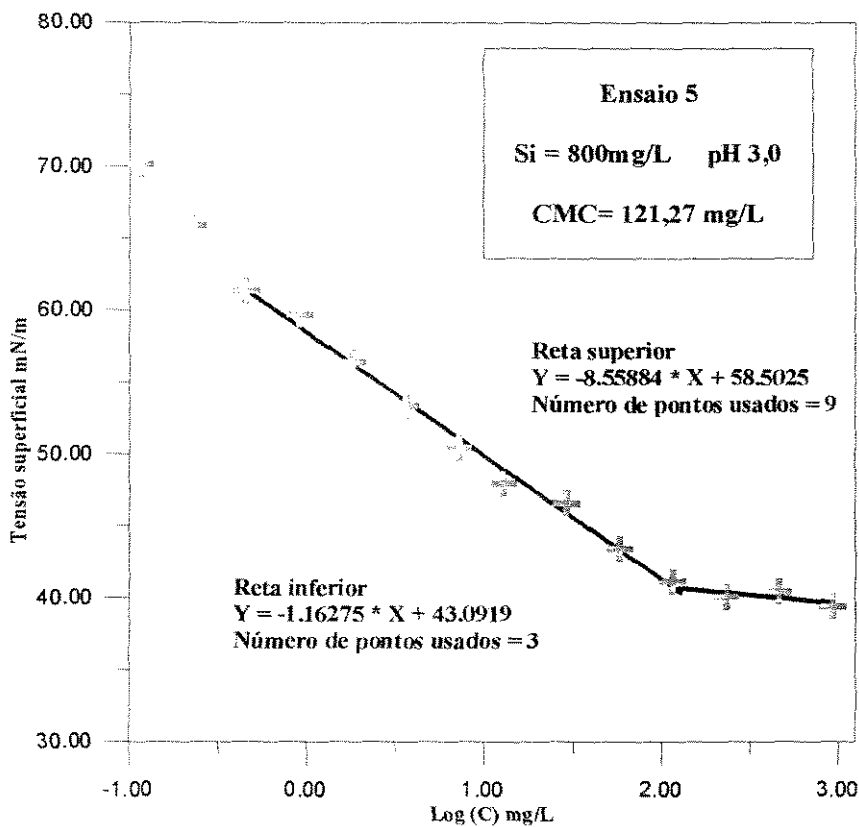


Figura 4.10 Tensão superficial vs log (C) do Ensaio 5

• Monitoramento pela absorvância

Foram obtidos as curvas de absorvância para cada fração de espuma, mas todas apresentaram o mesmo comportamento que é igual ao da combinação do espumado.

As curvas de absorvância da Solução Inicial e do espumado (lidos após a diluição) estão traçados na Figura 4.11. A absorvância do espumado é menor do que a da solução Inicial, confirmando que o processo de separação por espuma a concentrações acima da CMC não é eficiente e confirmando também que o uso da absorvância para monitorar o processo não é confiável devido a presença de interferentes.

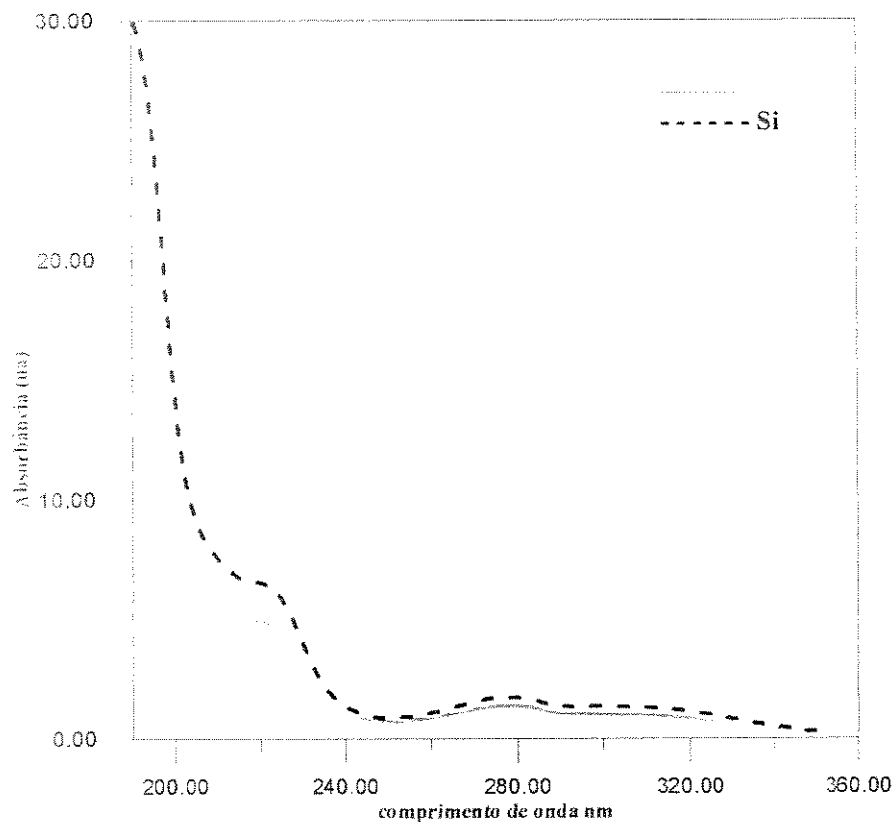


Figura 4.11 Curva de absorvância de Si e Se do Ensaio 5

4.2.3 SOLUÇÃO AQUOSA DE QUILAIA EM pH 5.0

Ensaio 6		
Si= 80 mg/L	pH 5,0	CMC = 347mg/L
Altura de Si: (Ha= 152,50 cm Hb= 153 cm)		
Vazão de N ₂ = 22,60 mL/min		

Foram realizados dois fracionamentos nas mesmas condições e denominados A e B. A Tabela 4.29 apresenta as quantidades envolvidas.

A espuma quebrou ainda úmida na coluna e demorou muito para colapsar após a coleta. Ocorreu boa distribuição de bolhas ao longo da coluna de bolhas, mas ao final

do fracionamento, observou-se a deposição de sólidos sobre a placa de distribuição de bolhas que não puderam ser identificados.

Tabela 4. 29 Dados do Fracionamento do Ensaio 6

Operação	Tempo de Fracionamento	Volume de Si	Volume de Sr	Massa Total de Espuma
	Horas	(mL)	(mL)	(g)
Fracionamento A	1: 30	945,74	930	34,89
Fracionamento B	1.15	948,84	917,83	34,56
			TOTAL	69,45

Diferentemente do Ensaio 1, feito a mesma concentração de Si mas em pH 3,0, houve boa reprodutibilidade nos dois fracionamentos realizados nas mesmas condições de operação.

- **Monitoramento pela massa seca**

A Tabela 4.30 apresenta os valores da massa seca obtidos após evaporação em Banho Maria e secagem em estufa à vácuo. Durante a evaporação observou-se uma grande formação de novelos nas soluções como aconteceu com o fracionamento a pH 3,0. Não houve formação da coloração verde musgo entretanto, e o produto ficou aderido às cápsulas de vidro. As cápsulas apresentaram uma coloração caramelo claro com ramificações transparentes presas ao vidro. Após a secagem em estufa à vácuo as amostras apresentaram um tom castanho, mas ainda foi possível visualizar os novelos e a presença de pigmentos verdes, principalmente em Sr.

Tabela 4.30 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio 6 (A e B)

Solução	massa seca (mg)	Concentração mg/L
Inicial	147,0	77,50
Resíduo A	50,20	54,00
Resíduo B	51,40	56,00
Espumado	41,10	591,7

Uma análise dos valores da Tabela 4.30 indica que a determinação do peso seco foi bem conduzida pois existe pouca diferença entre a massa calculada da solução inicial (147mg) e a soma das frações resultantes (142,74) e muito próximo dos 151,57 mg do extrato seco de quilaia gasto para confecção da solução inicial.

Os dados da Tabela 4.29 indicam que houve uma redução de volumes da ordem de 27 vezes entre a solução inicial e o espumado. Em relação a purificação, 101,62 mg de componentes sem atividade de superfície foram separados do espumado. O espumado retirou 28,79% dos sólidos do extrato sendo esse valor próximo ao conteúdo estimado de saponinas existentes no processo.

- **Enriquecimento por Massa Seca**

Ems (a) = 7,40

O aumento da concentração de tensoativos na espuma em relação a concentração inicial foi menor que o obtido para o fracionamento com espuma da solução aquosa de quilaia com a mesma concentração e pH 3,0 (Ensaio1).

Ensaio 7	
Si = 80 mg/l pH 5,0 CMC= 347 mg/L	
Altura de Si = 153,2	Vazão de N ₂ = 22,60 mL/min

Os dados do processo se encontram na Tabela 4.31. A espuma recolhida era mais úmida que a do Ensaio 1. O tempo de colapso da espuma foi menor, sendo inferior à 24 horas. Os pHs lidos estão na Tabela 4.32 e observa-se que existe uma diferença significativa entre o pH de Si (5,0), e de Se e de Sr.

Tabela 4.31 Dados do Fracionamento do Ensaio 7

Tempo de Fracionamento Horas	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
1:40	950,08	930,24	29,50

Tabela 4.32 pH das soluções do Ensaio 7

Solução	pH
Sr	6,02
Si	5,00
Se	3,52

- **Monitoramento pela tensão superficial**

Foram usadas cubetas pequenas de 4,40 cm diâmetro e 2,80 altura, com 20 mL de solução para leitura da tensão superficial.

Os resultados apresentados na Tabela 4.33 comprovam que a solução residual não está esgotada em tensoativos.

Comparando-se a Tabela 4.33 e 4.34 verificamos que o espumado precisou ser diluído cerca de 7 a 10 vezes para ter uma tensão superficial próxima de Sr, quatro vezes para alcançar a tensão superficial de Si e mais que 11 vezes para possuir uma tensão superficial igual a da água desionizada (73,35 mN/m).

Este resultando concorda com os valores obtidos por peso seco, que indicaram que 28% da massa seca inicial tinha sido transferida pela espuma ou seja que em relação a Si os tensoativos estão 4 vezes mais concentrados na espuma do que na solução inicial. Este resultado é semelhante ao encontrado, para a mesma concentração de Si, mas a pH 3,0, (Ensaio 2).

Não foi possível relacionar a tensão superficial e massa seca com a CMC do espumado pois a diluição do espumado não alcançou o patamar da CMC como pode ser confirmado na Figura 4.12

Tabela 4.33. Tensão Superficial do Resíduo, da solução Inicial, e do Espumado, Ensaio 7

Solução	Tensão Superficial (mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
Água desionizada	73,50	—	73,50
Sr	55,61	55,79	55,70
Si	48,49	48,40	48,64
Se	40,86	40,40	40,63

Tabela 4.34 Variação da tensão superficial do espumado com a diluição**(Ensaio 7)**

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
591,8	38,95	39,92	39,94
295,9	42,58	41,09	41,84
147,9	42,66	42,64	42,65
73,97	44,63	44,43	44,53
36,99	49,81	48,47	49,14
18,49	52,10	51,77	51,94
9,250	53,43	53,75	53,59
4,620	55,78	55,77	55,78
2,310	60,51	58,91	59,71
1,160	63,78	63,07	63,43
0,580	66,44	67,97	67,20
0,290	72,46	74,02	73,24

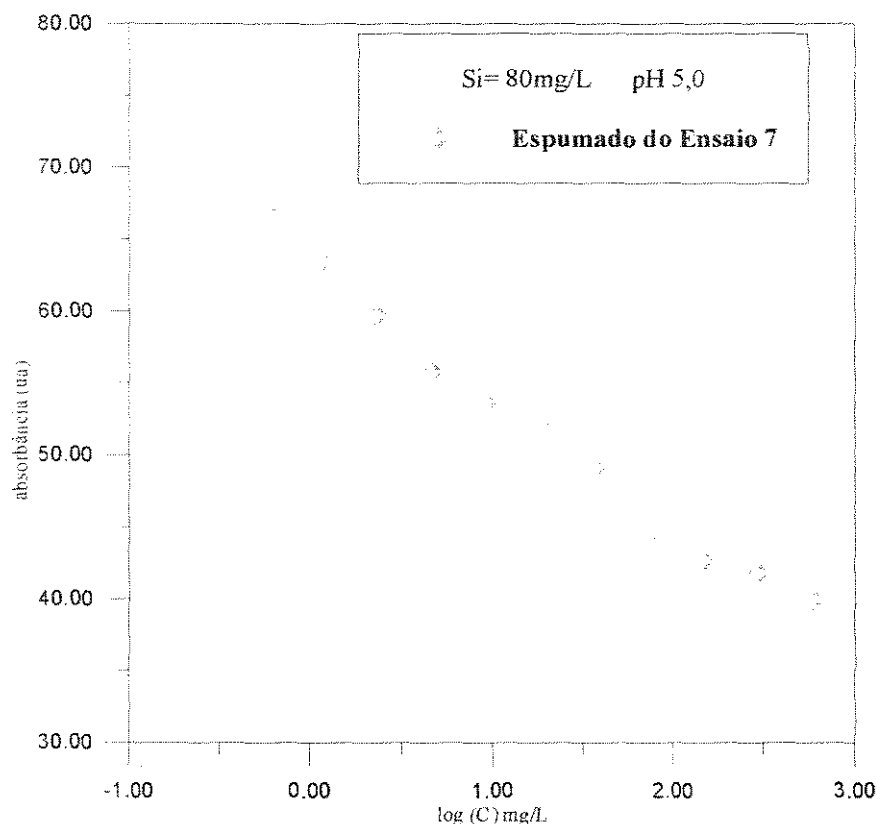


Figura 4.12 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio 7

- **Monitoramento pela absorbância**

As curvas de absorbância são apresentadas nas Figura 4.13 e foram levantadas com água deionizada e pH 5,0 como referência. Semelhantemente ao que foi constatado no pH 3,0, neste ensaio, a absorbância do solução residual é maior do que a solução inicial. Mas contrariamente ao constatado a pH 3,0 após a diluição a absorbância da solução inicial é maior que da solução residual. O enriquecimento do espumado na região de 210nm encobre a pronunciada inflexão presente na solução inicial e residual entre 224-218nm. Os valores das áreas calculadas entre 190-240 nm estão na Tabela 4.35

Com os resultados de tensão superficial e do peso seco conclui-se que a solução de 80 mg/L em pH 5,0 fornece um espumado menos rico em tensoativos e com um enriquecimento menor do que o obtido à mesma concentração à pH 3,0.

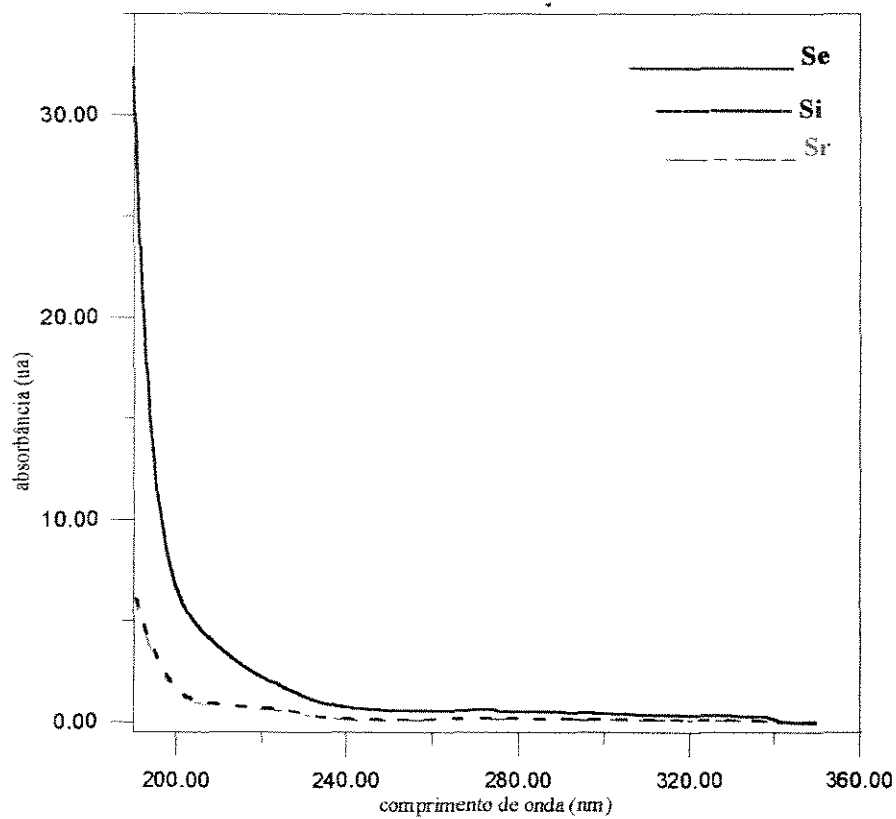


Figura 4.13 Curva de absorvância das soluções do Ensaio 7

Tabela 4.35 Áreas (Absorvância vs comprimento de onda) de absorção das soluções do Ensaio 7

Solução	Área
	190-240
Se	305,75
Si	72,05
Sr	66,70

Ensaio 8	
Si = 350 mg/l	pH 5,0 CMC= 347 mg/L
Altura de Si=152,4 cm	Vazão de N ₂ = 22,60 mL/min

Foi realizado um fracionamento, a espuma foi coletada em becheres diferentes. A espuma coletada era bastante úmida. Os dados do ensaio 8 se encontram na Tabela 4.36.

Tabela 4.36 Dados do Fracionamento do Ensaio 8

Tempo de Fracionamento Horas	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
3,40	945,12	682,17	226,04

• Monitoramento pela massa seca

Durante a evaporação das soluções não houve a formação de novos nas soluções evaporadas. No final da evaporação observou-se a presença de escamas aderidas ao vidro. As capsulas após secagem em estufa á vácuo apresentaram coloração típica de calda de açúcar.

Os valores totais de massa seca encontrados e as concentrações de Si, Se e Sr encontrados a partir dos dados da Tabela 4.36 encontram-se na Tabela 4.37.

Tabela 4.37 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio 8

Solução	Massa seca (mg)	Concentrações (mg/L)
Inicial	256,38	271,27
Resíduo	170,13	249,40
Espumado	152,55	674,88

Os valores da Tabela 4.37 indicam que há uma discrepância entre a massa calculada da solução inicial (256,38 mg) e a soma das massas das soluções resultantes (322,68 mg). Assim como em relação a massa consumida para confecção do volume de Si fracionado 330,79 mg. Observou-se que na evaporação de soluções provenientes do fracionamento de soluções do extrato e quilaia com concentrações iguais ou maiores que a CMC, há a formação de uma camada cerosa acima da soluções evaporadas e que pode ter interferido na determinação da massa seca. A precisão nessas determinações não melhora com maior tempo na estufa

Os dados da Tabela 4.36 e 4.37 também mostram que 42,27% dos sólidos do extrato foram retirados pelo espumado. A relação entre estes valores e a massa de espuma coletada, indicam baixos índices de purificação, com arraste da solução inicial. O enriquecimento por massa seca foi calculado pela Equação 3.3 .

Enriquecimento por massa seca (Equação 3.3)

$E_{ms} = 1,93$

O enriquecimento por massa seca apresentou um valor bem menor que o encontrado para o mesmo Ensaio a pH 3,0 e para o Ensaio antes da CMC a pH 3,0. Comprovando o arraste de solução líquida pela espuma e a baixa eficiência do processo.

Ensaio 9		
Si= 350 mg/L	pH 5,0	CMC= 347 mg/L
Altura de Si= 159,10 cm Vazão de N ₂ = 22,60 ml/min		

A espuma produzida após 4 horas de fracionamento foi removida da coluna sem que tenha ocorrido a drenagem, a espuma não adquiriu a aparência seca. Os dados do processo estão na Tabela 4.38. Apesar das mesmas condições de operação a massa de espuma do Ensaio 8 foi 50% superior a do Ensaio 9. Na Tabela 4.39 encontra-se os pHs lidos das soluções, que permaneceram próximos a 5,0.

Tabela 4.38 Dados do Fracionamento do Ensaio 9

Tempo de Fracionamento Horas	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
5.15	986,68	792,56	149,04

Tabela 4.39 pH das soluções do Ensaio 8

Solução	pH
Si	5,00
Se	4,83
Sr	4,90

- **Monitoramento pela Tensão Superficial**

Os dados com as tensões superficiais das soluções envolvidas no fracionamento estão listadas na Tabela 4.40 e indicam um esgotamento da solução residual em tensoativos. A curva de decaimento da espuma com a diluição encontra-se na Tabela 4.41 e teve seus valores plotados na Figura 4.14

Com os dados do peso seco e da absorbância verificou-se que a espuma estava concentrada em tensoativos mas, pouca purificada em relação a solução inicial.

A análise da Tabela 4.41 e da Figura 4.14 indicam que o espumado não alcançou a região assintótica da CMC, não permitindo sua determinação.

Tabela 4.40 Tensão Superficial das Soluções Inicial, Resíduo e Espumado
(Ensaio 9)

Solução	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
Água desionizada	73,47	—	73,47
Si	44,14	44,46	44,30
Sr	72,02	72,25	72,16
Se	40,30	40,29	40,29

Tabela 4.41 Variação da Tensão Superficial do Espumado com a diluição, Ensaio 9

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
674,8	39,45	38,53	38,99
337,4	40,71	39,82	40,27
168,7	43,68	42,97	43,33
84,36	44,04	43,36	43,70
42,18	49,87	49,91	49,89
21,09	52,94	52,48	52,71
10,54	54,18	52,14	53,16
5,270	57,51	55,11	56,31
2,630	59,25	58,88	59,07
1,320	60,53	60,76	60,65
0,659	63,87	63,60	63,74
0,329	68,16	69,69	68,93
0,165	71,50	71,53	71,52
0,0824	74,48	74,20	74,34

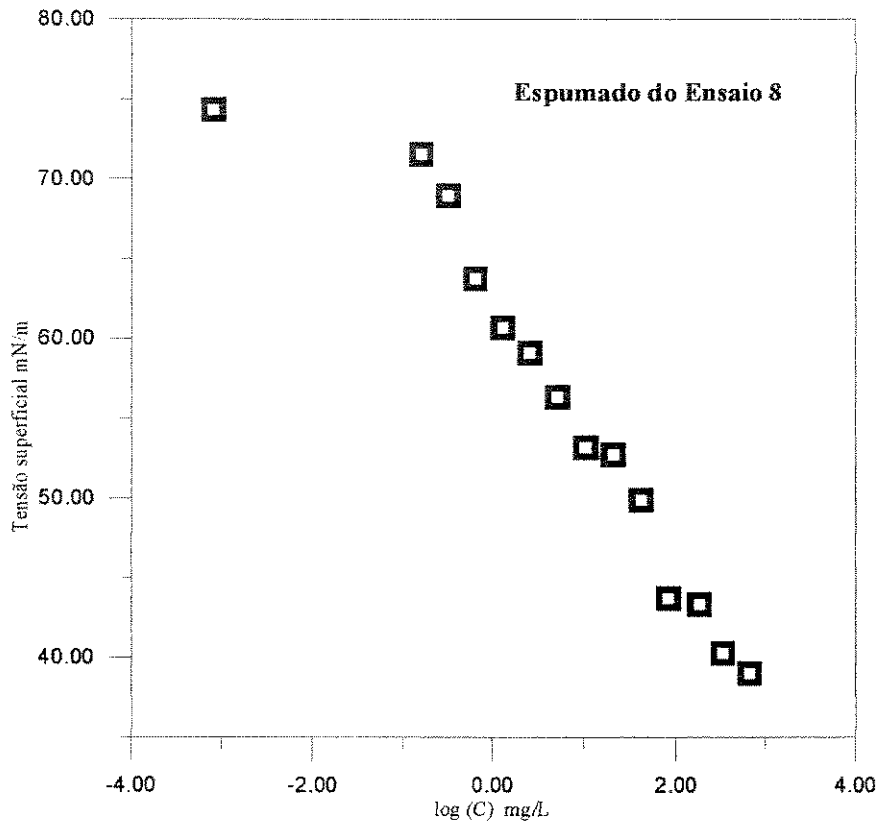


Figura 4.14 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio 9

O espumado foi diluído 13 vezes para chegar a Ts da água e cerca de 12 vezes para chegar a Ts do resíduo. O espumado, pela Ts, está duas vezes mais concentrado que Si.

- **Monitoramento por absorbância**

As curvas de absorbâncias apresentaram comportamento de absorção dentro do esperado, na seguinte ordem decrescente de absorção $Se > Si > Sr$

O cálculo da área se encontra na Tabela 4.42.

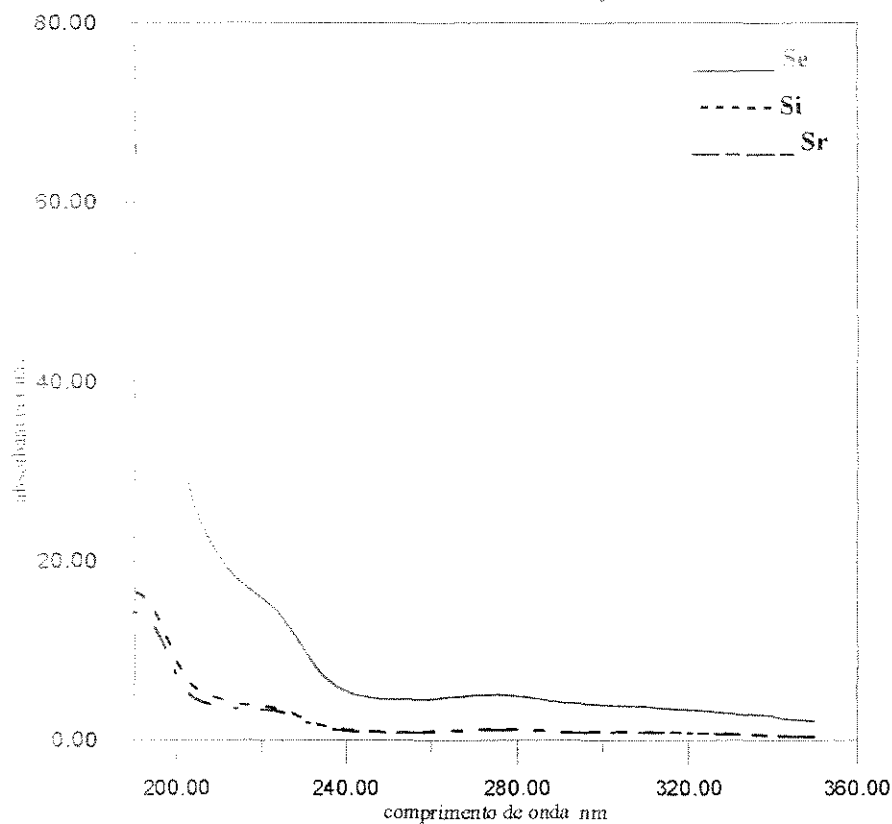


Figura 4.15 Curva de absorvância as soluções do Ensaio 9

Tabela 4.42 Áreas (absorvância vs comprimento de onda) de absorvância da soluções do Ensaio 9

Soluções	Áreas
	190-240
Si	283,8
Se	1213
Sr	243,10

Uma razão entre as áreas calculadas para a espuma e a solução inicial fornece o valor 4.27 respectivamente.

Ensaio 10		
Si = 800 mg/L	pH 5,0	CMC = 347 mg/L
Altura de Si= 152, 40 cm Vazão de N ₂ = 22,60mL/min		

Os dados do processo do Ensaio 10 são apresentados na Tabela 4.43. A espuma coletada era rígida e úmida. O espumado foi abundante e teve de ser coletado em vários becheres. O espumado obtido da primeira fração de espuma apresentava coloração amarelo pálido semelhante a coloração da solução inicial. O valor da massa da espuma coletada comprovam que uma grande quantidade de solução foi transferida com a espuma. Os valores de pHs lidos se encontram na Tabela 4.44.

Tabela 4.43 Dados do Fracionamento do Ensaio 10

Tempo de Fracionamento Horas	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
5.10 min	945,12	395,04	451,77

Tabela 4.44 pH das soluções do ensaio 10

Amostra	pH
Se	5,03
Si	5,00
Sr	4,96

•Monitoramento pela Massa Seca

A espuma evaporada foi a combinação de todas as frações de espuma. Durante a evaporação a solução da espuma apresentou a formação de um grande novelo e a presença de particulados que se sedimentavam. O resíduo final de evaporação das

soluções apresentou coloração castanha. Ao retirar-se da estufa à vácuo a coloração nas cápsulas manteve-se castanha, mas adquiriu uma película cerosa em volta das bordas das capsulas com minúsculas gotículas oleosas aderidas à parede do vidro. Os dados da massa seca encontram-se na Tabela 4.45.

Tabela 4.45 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio10

Amostra	Massa seca (mg)	Concentração (mg/L)
Inicial	750,0	797,1
Residuo	211,1	534,4
Espumado	448,5	992,8

Uma análise dos valores da Tabela 4.45 indicam, como quase todos os ensaios anteriores, que há uma pequena discrepância no balanço de massa seca.

Os dados da Tabela 4.43 e 4.45 ainda indicam que 67,99 de sólidos do extrato foram separados da solução inicial. Com o valor encontrado para o enriquecimento por peso seco. Equação 3.3, confirma-se que acima da CMC apesar de se obter uma espuma concentrada em sólidos, o processo é ineficiente para purificação devido ao grande arraste de solução.

- Enriquecimento por peso seco

$E_{ms} = 1,24$

O enriquecimento por peso seco diminui com o aumento da concentração inicial de Si.

Ensaio 11		
Si = 800 mg/L	pH 5,0	CMC= 347 mg/L
Altura de Si= 156,40 cm Vazão de N ₂ = 22,60 mL/ min		

Os dados do Ensaio 11 encontram-se na Tabela 4.46 . O comportamento das soluções frente a operação foi semelhante ao Ensaio 10. A massa do espumado do Ensaio 10 foi 18% superior ao do Ensaio 11. Os pH s lidos estão na Tabela 4.47.

Tabela 4.46 Dados do Fracionamento do Ensaio 11

Tempo de Fracionamento Horas	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
5,75	971,17	446,52	381,69

Tabela 4.47 pH das soluções do ensaio 11

Amostra	pH
Sr	5,01
Si	5,00
Se	5,15

• Monitoramento pela Tensão Superficial

As medidas de tensão superficial foram realizadas com um volume de 50 mL e na temperatura de 25 °C, em cubetas de diâmetro de 6,65 cm e altura de 3,75 cm. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.4.8e verifica-se que a solução residual não se encontra esgotada em tensoativos. Comparando-se com a Tabela 4.49, os valores obtidos para a diluição do espumado, verifica-se que Si e Se apresentam praticamente o mesmo valor de tensão superficial.

O espumado precisou ser diluído mais que 9 vezes para alcançar a tensão superficial do resíduo e mais de 11 vezes para alcançar a tensão superficial da água.

Na Figura 4.16 visualiza-se a CMC do espumado como 540 mg/L. A relação entre a CMC do extrato de quilaia (347 mg/L) e a do espumado, foi de 0,6 vezes. O alto valor da CMC do espumado, confirma que o fracionamento arrastou com os tensoativos outros componentes presentes no extrato de quilaia. O fracionamento nestas condições, acima da CMC e a pH 5,0, não foi seletivo para purificação dos sólidos totais.

Tabela 4.48 Tensão Superficial da Solução Inicial e do Resíduo, Ensaio 11

Solução	Tensão Superficial		
	mN/m		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
Água deionizada	73,41	—	73,41
Sr	68,31	62,04	65,18
Se	39,89	38,86	39,13
Si	39,63	38,17	39,34

Tabela 4.49 Variação da tensão superficial do espumado com a diluição (Ensaio 11)

Concentração mg/L	Tensão Superficial mN/m		
	1º ciclo	2º ciclo	Média
992,8	39,39	38,86	39,13
496,4	39,83	39,30	39,57
248,2	43,40	42,38	42,89
124,1	46,06	47,28	46,67
62,05	49,78	48,73	49,26
31,03	50,70	50,04	50,37
15,51	52,49	51,94	52,22
7,760	54,49	54,14	54,32
3,980	58,52	57,04	57,78
1,940	64,54	64,62	64,58
0,970	69,10	68,53	68,82
0,480	73,01	72,27	72,64

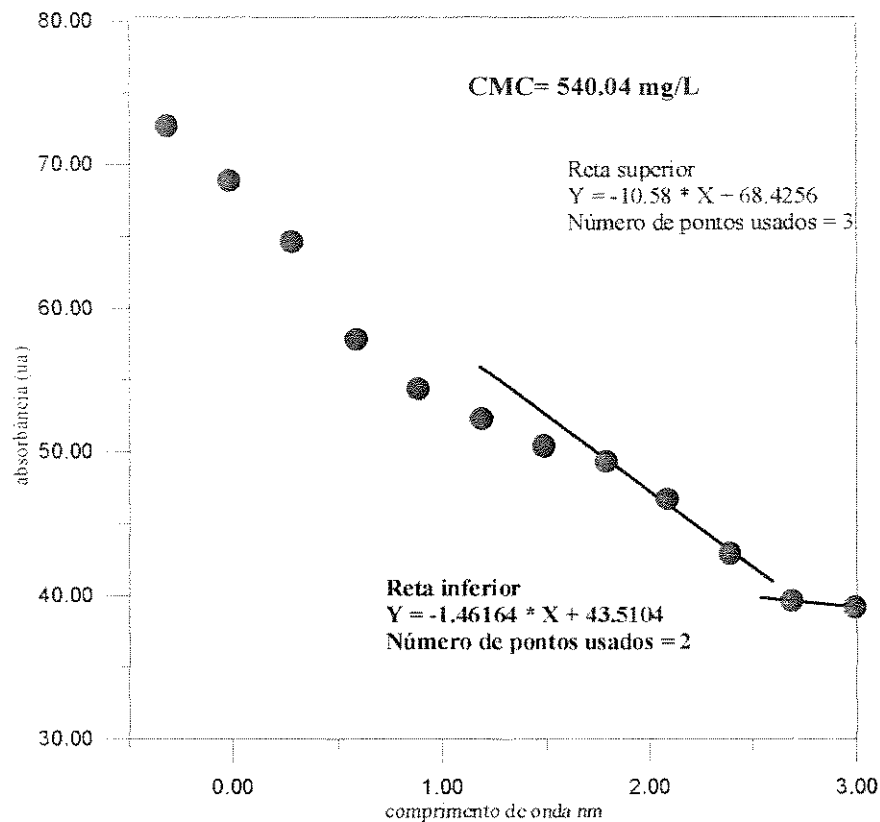


Figura 4.16 Tensão superficial vs log do espumado do Ensaio 11

• Monitoramento pela absorvância

As absorvâncias são apresentadas na Figura 4.17. Observa-se que houve um pequeno enriquecimento em saponinas no espumado, mas a absorvância da solução inicial é menor que a da solução residual.

Conforme já foi verificado a pH 3,0 , acima da CMC não se alcançou o objetivo de purificação de saponinas através do fracionamento por espuma, por isso não se calculou as áreas e o enriquecimento por absorvância.

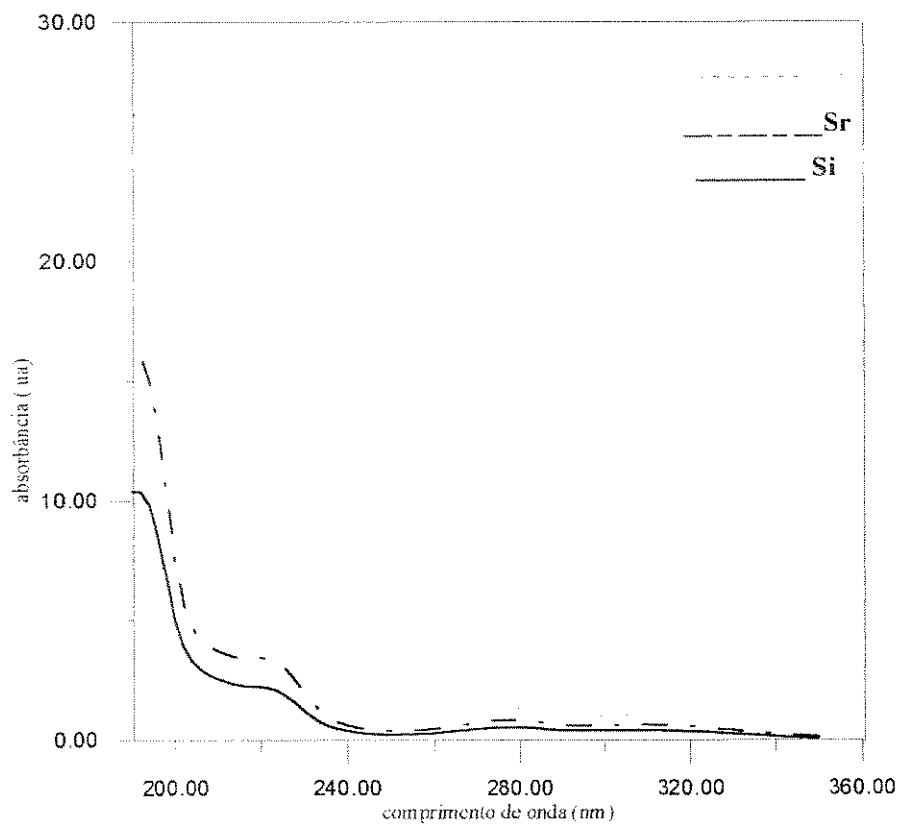


Figura 4.17 Curva de absorvância das soluções do Ensaio 11

4.24 SOLUÇÃO AQUOSA DE QUILAIA EM pH 7.0

Ensaio 12		
Si = 80 mg/L	pH 7,0	CMC= 388mg/L
Altura de Si= 154,40 cm Vazão de N ₂ = 22,60 mL/ min		

Foi realizado apenas um fracionamento e a espuma foi coletada em três frascos diferentes, sendo que a última fração de espuma tinha uma aparência seca. Observou-se alta taxa de drenagem da espuma na coluna sem chegar a abrir em forma de teia. Houve muita espuma residual, acima da solução, no final desse ensaio. Os dados se encontram na Tabela 4.50 e os pHs lidos estão na Tabela 4.51. O espumado é a mistura das três

frações de espuma colapsadas, e observa-se que o pH do espumado foi bem inferior ao pH da solução inicial.

Tabela 4.50 Dados do Fracionamento do Ensaio 12

Tempo de Fracionamento (horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
120	957,52	936,44	29,76

Tabela 4.51 pH das soluções do Ensaio 12

Solução	pH
Sr	6,81
Si	7,00
Se	5,19

• Monitoramento pela massa seca

A Tabela 4.52 apresenta os valores da massa seca obtidos após evaporação em Banho-Maria e secagem em estufa à vacuo.

Tabela 4.52 Massas totais e concentração em sólidos secos do Ensaio 12

Solução	Massa seca (mg)	Concentração (mg/L)
Inicial	75,30	78,60
Solução	51,70	55,20
Espumado	18,10	557,8

Os resultados da Tabela 4.52 indicam uma pequena discrepância entre os valores encontrados por peso seco para a solução inicial, 75,3 mg, e a soma das demais soluções, 69,8 mg/L. O valor da massa seca da solução inicial é próximo do valor da massa de extrato de quilaia utilizado que foi 76,58 mg.

Os dados da Tabela 4.50 indicam que houve uma redução de 32 vezes entre o volume da solução inicial e o espumado. O espumado retirou 25,93% de sólidos da solução inicial. Os valores de enriquecimento são inferiores aos encontrados para os pHs 3,0 e 5,0 mas estão dentro da faixa de valores esperados com base na composição do extrato.

• **Enriquecimento por massa seca**

Pela Equação 3.3 calculou-se o enriquecimento por massa seca.

E_{ms} = 6,97

Para os ensaios realizados na mesma concentração de Si mas em pH diferentes observa-se uma redução do enriquecimento com o aumento do pH.

Ensaio 13		
Si = 80 mg/L	pH 7,0	CMC = 388mg/L
Altura de Si= 155,4 cm Vazão de N ₂ = 22,60 mL/ min		

O Ensaio 13, que repetiu as condições do Ensaio 12, teve a espuma toda coletada em dois becheres. A espuma apresentou o mesmo comportamento descrito no Ensaio 12. Os dados referentes ao Ensaio 13 são apresentados na Tabela 4.53 e os pHs lidos, na Tabela 4.54.

Tabela 4.53 Dados do Fracionamento do Ensaio 13

Tempo de Fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa de Espuma (g)
15,54	963,73	948,73	21,68

Tabela 4.54 pH das soluções do Ensaio 13

Solução	pH
Sr	6,49
Si	7,00
Se	6,21

• Monitoramento pela tensão superficial

Os dados da tensão superficial encontrados estão na Tabela 4. 55 . Os valores confirmam que não houve esgotamento de tensoativos da solução residual. A seqüência de leituras da tensão superficial do espumado com a diluição se encontra na Tabela 4.56 e a ligação dos pontos na Figura 4.18. Observa-se que, da mesma forma que no pH 5.0 em uma concentração o espumado não alcançou o patamar da CMC .

O espumado precisou ser diluído três vezes para alcançar a tensão superficial da água e mais sete vezes para alcançar a tensão superficial do resíduo e mais de nove vezes para alcançar a tensão superficial da água.

Tabela 4.55 Tensão Superficial do Resíduo, da Solução Inicial e do Espumado, Ensaio13

Solução	Tensão Superficial		
	(mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
Água deionizada	73,47	—	73,47
Sr	64,88	66,78	65,83
Se	40,43	40,10	40,26
Si	49,29	50,12	49,71

Tabela 4.56 Variação da Tensão superficial do espumado com a diluição (Ensaio 13)

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial		
	(mN/m)		
	1º Ciclo	2º Ciclo	Ciclo médio
557,8	40,12	39,89	40,00
278,9	40,46	44,56	42,51
139,4	47,97	48,23	48,10
69,72	50,71	51,42	51,07
34,86	53,82	54,15	53,98
17,43	56,62	56,94	56,78
8,710	59,23	60,72	59,98
4,360	68,46	70,58	69,52
2,180	70,17	73,11	71,64
1,090	72,07	73,24	72,66

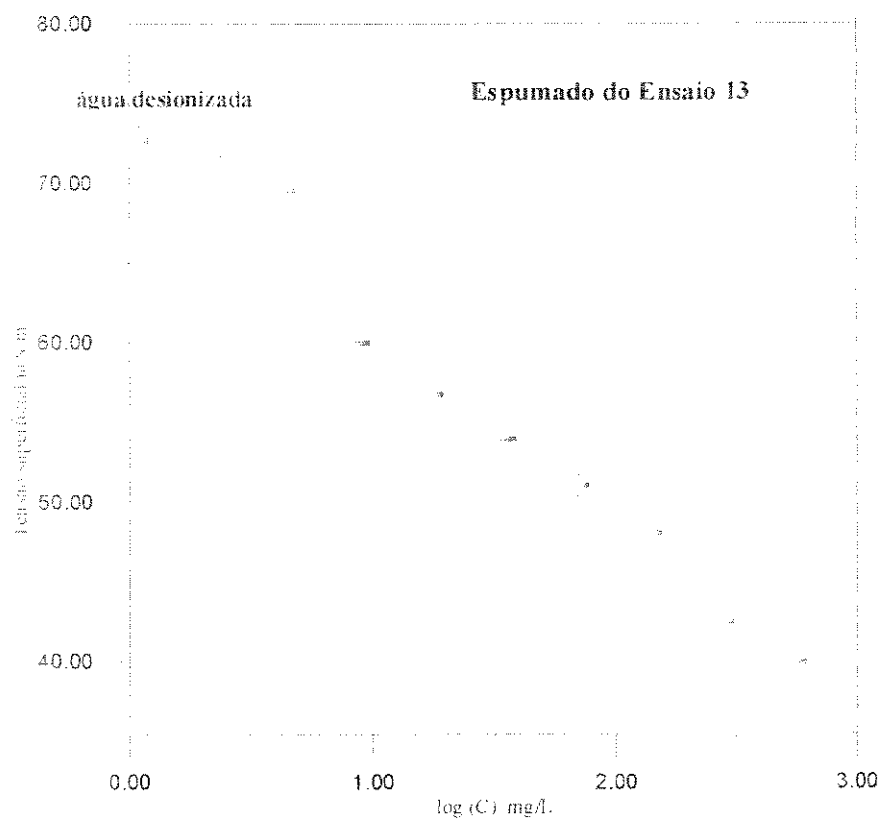


Figura 4.18 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio 13

- Monitoramento pela absorvância

A curva de absorvância obtida com os produtos do Ensaio 13, lidos após diluição estão na Figura 4.19 . Os valores das áreas calculados entre 190-240 nm estão na Tabela 4.57. Observa-se o mesmo comportamento encontrado no ensaio a pH 3,0 nesta mesma concentração, isto é, o espumado apresenta absorvância destacadamente maior que a solução residual, que apresenta absorvância maior que a da solução inicial.

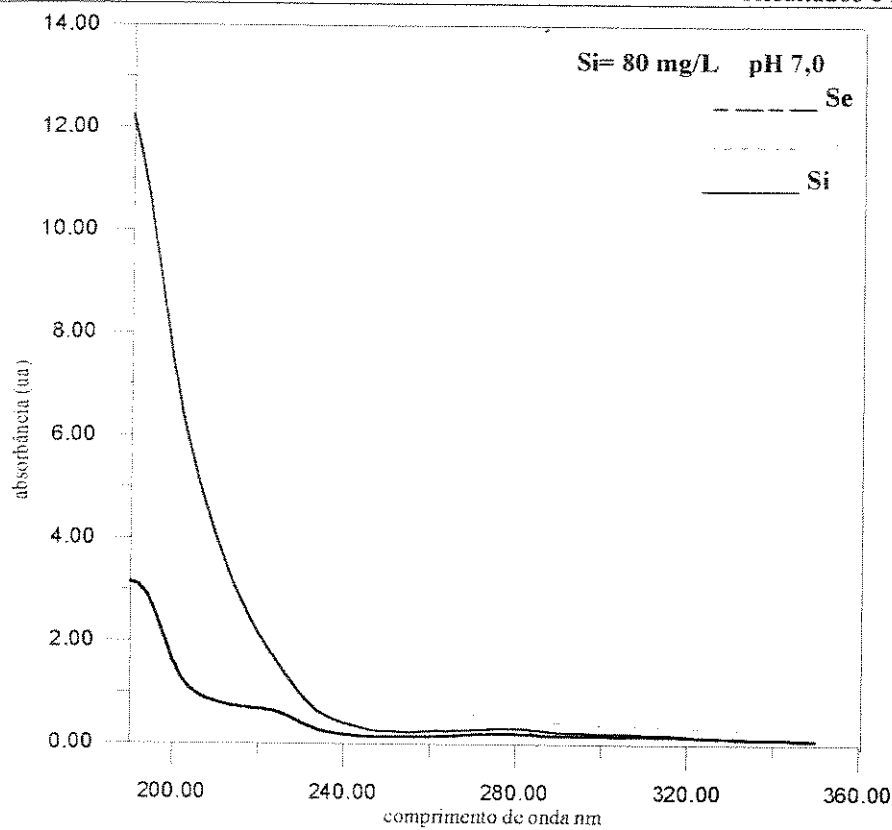


Figura 4.19 Curva de absorbância das soluções do Ensaio 13

Tabela 4.57 Áreas (Absorbância vs comprimento de onda) de absorção das soluções do Ensaio 13

Solução	Área (média)
	(240- 190 nm)
Se	207,40
Si	51,76
Sr	92,95

Ensaio 14
Si=380 mg/L pH 7,0 CMC=388 mg/L
Altura de Si = 158 cm Vazão de N ₂ = 22,60 mL/min

Foi realizado um fracionamento que forneceu material suficiente para análise do peso seco. A espuma foi coletada em cinco frações. Nas condições de operação a espuma colapsou ainda úmida, na coluna e foi expulsa na forma de uma fase compacta. Os dados referentes ao Ensaio 14 são apresentados na Tabela 4.58, e observa-se maior volume de espumado do que nos dois ensaios com 80 mg/L.

Tabela 4.58 Dados do Fracionamento do Ensaio 14

Tempo de Fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa de Espuma (g)
4,20	979,85	705,74	202,35

• Monitoramento pela massa seca

A Tabela 4.59 apresenta os valores da massa seca obtidos após evaporação em Banho-Maria e secagem em estufa à vácuo. Durante a evaporação as soluções apresentaram coloração amarelada.

Tabela 4.59 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio 14

Solução	Massa seca (mg)	Concentração (mg/L)
Inicial	364,3	371,8
Resíduo	187,0	265,0
Espumado	142,2	703,0*

Os resultados da Tabela 4.59 indicam que há uma certa discrepância entre os valores encontrados por peso seco para a solução inicial, e a soma das demais soluções (329,29 mg/L). O valor também discorda do valor da massa de extrato de quilaia.

Esses dados confirmam o baixo índice de purificação nessas condições de fracionamento pois houve uma extração de 43,2% em sólidos da solução inicial e uma redução de volumes entre a solução inicial e o espumado de apenas 4,8

- **Enriquecimento por massa seca**

Pela Equação 3.3 calculou-se o enriquecimento por massa seca.

$$Ems = Ce / (Ci - Ce) = 1,85$$

Ensaio 15		
Si= 380 mg/L	pH 7,0	CMC= 388 mg/L
Altura de Si = 155,2 cm Vazão de N ₂ = 22,60 mL/min		

Este ensaio complementou o Ensaio 14 e forneceu material suficiente para análise da tensão superficial e da absorbância.. A espuma, em menor volume do que no Ensaio 14, foi coletada em duas frações e a massa total do espumado e os dados do Ensaio 15 encontram-se na Tabela 4.60 A aparência da espuma foi igual com a do Ensaio 14. Os pHs das soluções estão na Tabela 4.61 No final do fracionamento houve grande depósito de partículas sobre a placa porosa que chegaram a causar o seu entupimento.

Tabela 4.60 Dados do Fracionamento do Ensaio 15

Tempo de Fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
5,15	962,49	759,07	94,76

Tabela 4.61 pHs das soluções do Ensaio 15

Solução	pH
Sr	6,64
Si	7,00
Se	6,46

• **Monitoramento pela tensão superficial**

Os dados de tensão superficial encontrados estão na Tabela 4.62 e comprovam o esgotamento da solução residual em tensoativos. A tensão superficial do espumado é bem menor que a tensão superficial da solução inicial. A seqüência da leitura da tensão superficial com a diluição do espumado se encontra na Tabela 4.63 e a plotagem dos pontos na Figura 4.20. O espumado apresenta CMC bem próxima a CMC do extrato de Quilaia no mesmo pH comprovando a baixa eficiência do processo.

O espumado precisou ser diluído três vezes para alcançar a tensão superficial da solução inicial, e mais que nove vezes para alcançar a tensão superficial do resíduo e mais que dez vezes para alcançar a tensão superficial da água.

Tabela 4.62 Tensão Superficial do Resíduo, da Solução Inicial e do Espumado, Ensaio 15

Solução	Tensão Superficial		
	(mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Média
Água deionizada	73,50	—	73,50
Sr	70,50	71,86	71,18
Se	39,87	39,61	39,74
Si	44,39	44,47	44,43

Tabela 4.63 Variação da Tensão superficial do espumado com a diluição**(Ensaio 15)**

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º Ciclo	2º Ciclo	Média
703,0	39,80	39,56	39,68
351,5	40,29	40,33	40,31
175,7	43,62	43,40	43,51
87,88	46,41	46,66	46,53
43,94	49,96	50,10	50,06
21,97	53,49	53,44	43,46
10,98	57,93	57,63	57,78
5,490	58,74	58,38	58,56
2,750	64,12	63,87	64,00
1,370	67,32	67,33	67,32
0,690	69,23	69,32	69,27
0,340	73,08	73,24	73,16

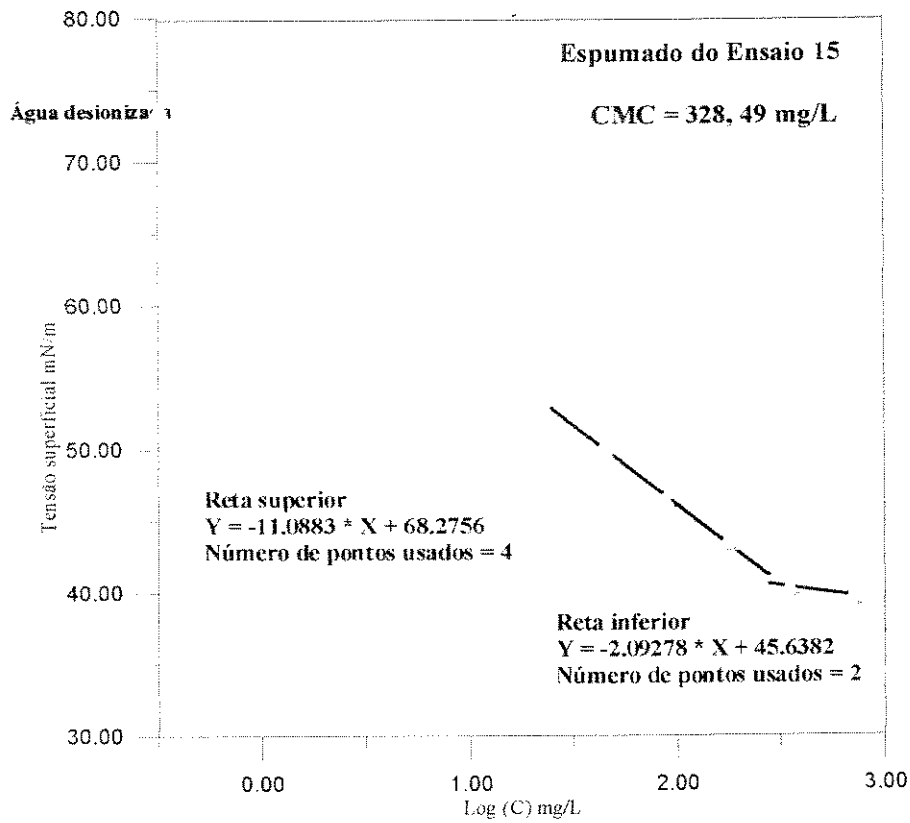


Figura 4.20 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio 15

- **Monitoramento pela absorvância**

As curvas de absorvância das soluções do Ensaio 15 se encontram na Figura 4.21. As três curvas quase se sobrepõem, confirmando uma baixa purificação em saponinas no espumado em relação ao extrato inicial. As áreas de absorção foram calculadas e se encontram na Tabela 4.64.

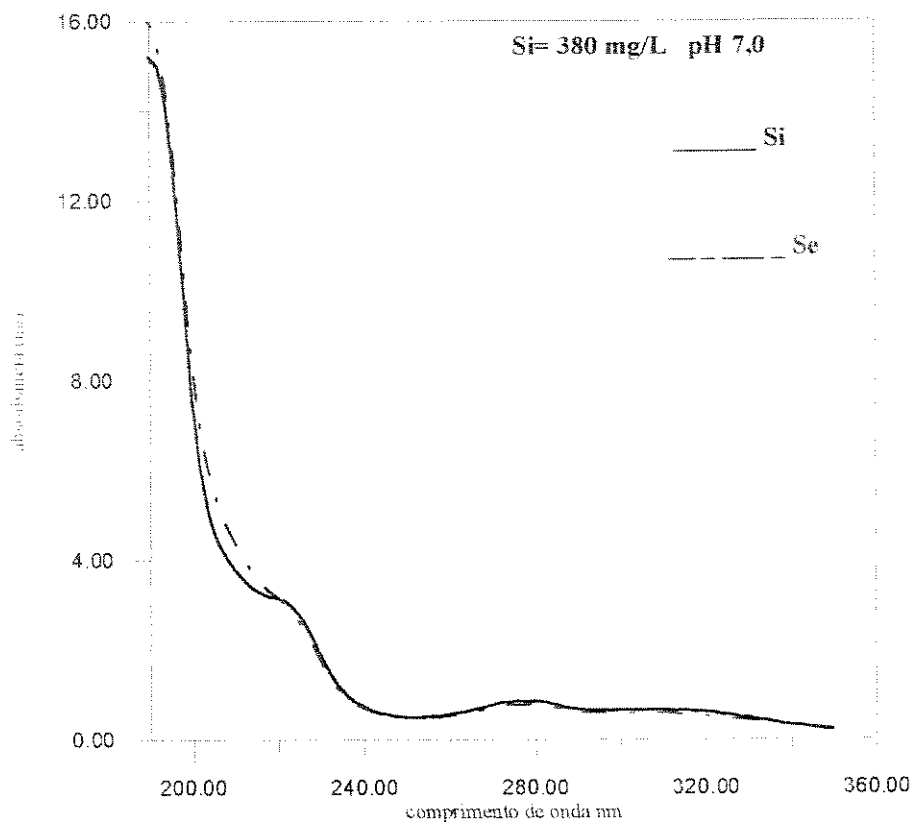


Figura 4.21 Curva de absorbância das soluções do Ensaio 15

Tabem 4.64 Áreas (Absorbância vs comprimento de onda) de absorção das soluções do Ensaio 15

Solução	Área (média)
	(240- 190 nm)
Se	262,20
Si	230,60
Sr	226,05

Ensaio 16
Si= 800 mg/L pH 7,0 CMC= 388 mg/L
Altura de Si = 153 cm Vazão de N ₂ = 22,60 mL/min

Foi realizado um fracionamento que forneceu material suficiente para todas as análises. Nas condições de operação acima da CMC a espuma arrebentou ainda úmida, dentro da coluna de espuma e saiu como um pacote compacto de espuma. Os dados referentes ao Ensaio 16 são apresentados na Tabela 4.65 e os pHs lidos das soluções na Tabela 4.66, sendo que o pH do espumado é a mistura de espuma colapsada.

Tabela 4.65Dados do Fracionamento do Ensaio 16

Tempo de Fracionamento (Horas)	Volume de Si (mL)	Volume de Sr (mL)	Massa Total de Espuma (g)
5,30	948,84	387,60	457,85

Tabela 4.66 pHs das soluções do Ensaio 16

Solução	PH
Sr	6,84
Sr	6,30
Si	7,00

• Monitoramento pela massa seca

A Tabela 4.67 apresenta os valores da massa seca obtidos após evaporação em Banho-Maria e secagem em estufa à vácuo. Durante a evaporação as soluções apresentaram coloração amarelada e no final da secagem em estufa, as cápsulas apresentaram resíduos pretos.

Tabela 4.67 Massas totais e concentrações em sólidos secos do Ensaio 16

Solução	Massa seca (g)	Concentração (mg/L)
Inicial	698,9	736,6
Resíduo	240,5	620,6
Espumado	328,7	1027

Os resultados da Tabela 4.67 indicam uma grande discrepância entre os valores encontrados por peso seco para a solução inicial, e a soma das demais soluções.

Os dados da Tabela 4.66 indicam uma extração 57,7 % de sólidos no espumado da solução inicial, com uma redução de volumes entre a solução inicial e o espumado de apenas 2,1.

• Enriquecimento por massa seca

Na equação 3.3 calculou-se o enriquecimento por massa seca.

$$E_{ms} = 1,28$$

- **Monitoramento pela tensão superficial**

Os dados de tensão superficial encontrados estão na Tabela 4.68. Observou-se que não ocorreu esgotamento da solução residual em tensoativos e que a tensão superficial do espumado é próxima a tensão superficial da solução inicial. A sequência da leitura da tensão superficial com a diluição do espumado se encontra na Tabela 4.69 e a locação dos pontos na Figura 4.22. O espumado apresentou CMC maior que a CMC do extrato de quilaia no mesmo pH comprovado a baixa eficiência do processo e o arraste de interferentes pela espuma.

O espumado precisou ser diluído três vezes para alcançar a tensão superficial da solução inicial, e mais que oito vezes para alcançar a tensão superficial do resíduo e mais que doze vezes para alcançar a tensão superficial da água.

Tabela 4.68 Tensão Superficial do Resíduo, da Solução Inicial e do Espumado, Ensaio16

Solução	Tensão Superficial (mN/m)		
	1 ciclo	2 ciclo	Ciclo médio
Água desionizada	73,43	—	73,43
Sr	61,43	61,36	61,40
Se	39,87	39,61	39,74
Si	40,66	40,69	40,68

Tabela 4.69 Variação da Tensão superficial do espumado com a diluição (Ensaio 16)

Concentração (mg/L)	Tensão Superficial (mN/m)		
	1º Ciclo	2º Ciclo	Média
1027	40,73	40,51	40,62
513,6	40,59	40,44	40,51
256,8	42,32	42,50	41,41
128,40	45,58	45,62	45,60
64,20	49,71	49,87	49,74
32,10	51,48	51,97	51,73
16,05	54,03	53,96	54,00
8,020	57,38	57,22	57,30
4,010	59,72	59,96	59,84
2,010	63,28	63,46	63,37
1,000	70,17	69,83	70,00
0,500	72,29	72,20	72,25
0,250	72,61	72,38	72,50

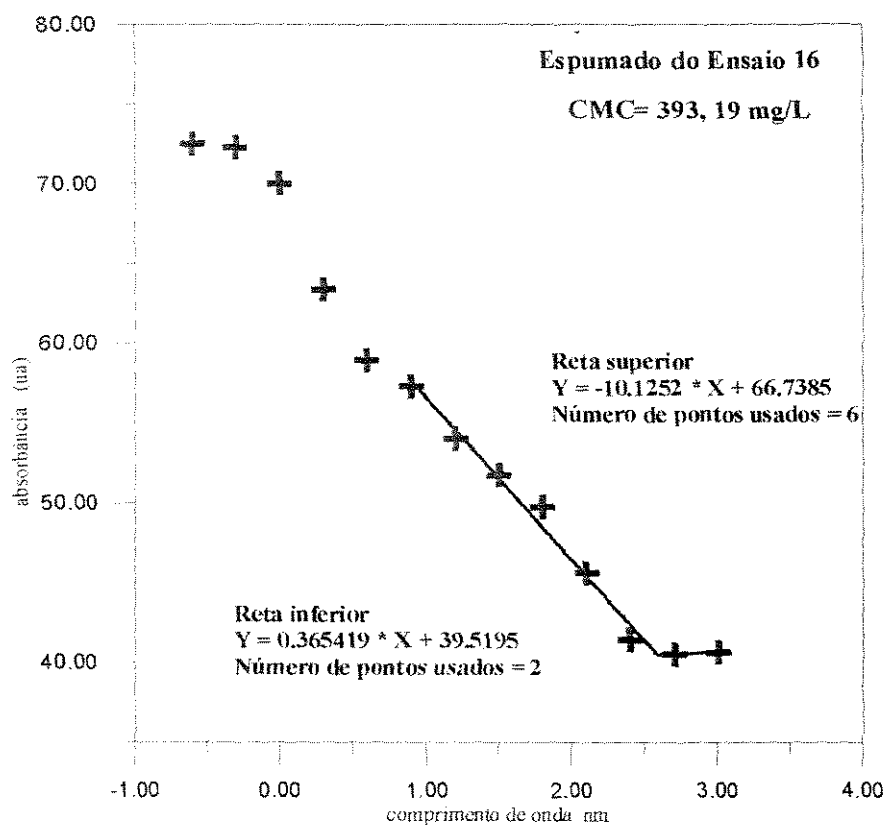


Figura 4.22 Tensão superficial vs log da concentração do espumado do Ensaio 16

- **Monitoramento pela absorvância**

As curvas de absorvância das soluções do Ensaio 16 se encontram na Figura 4.23 e são muito semelhantes entre si, confirmando a baixa eficiência de separação de processos que usam soluções de concentração acima da CMC. A absorvância da solução residual é maior que da solução inicial. As áreas de absorção foram calculadas e se encontram na Tabela 4.70.

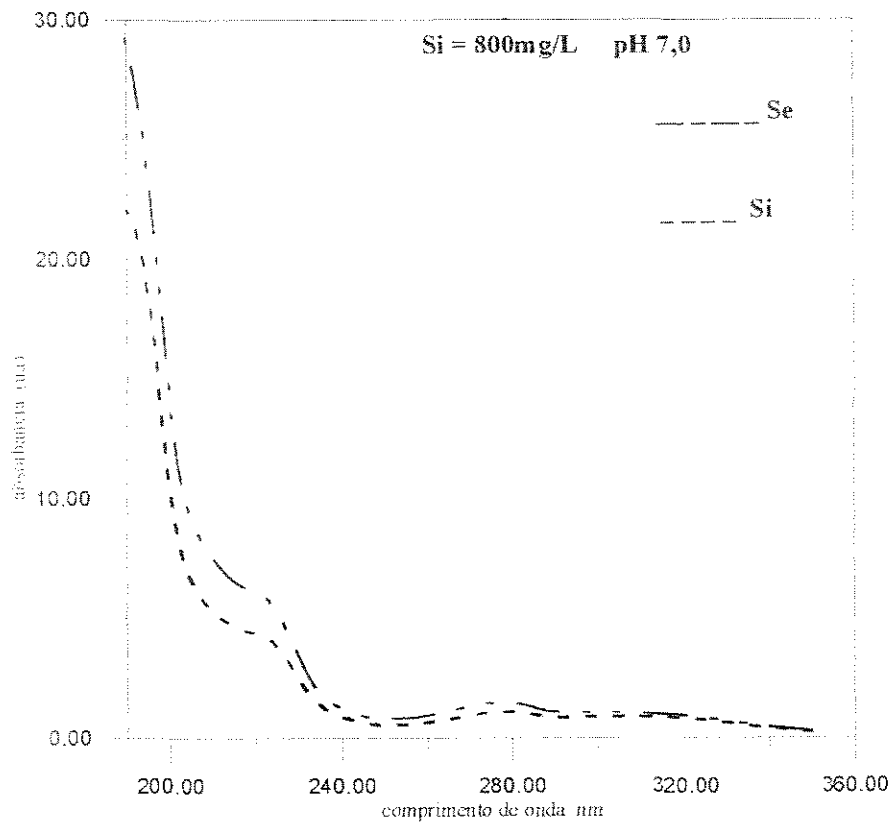


Figura 4.23 Curva de absorbância das soluções do Ensaio 16

Tabela 4.70 Áreas (Absorbância vs comprimento de onda) de absorção das soluções do Ensaio 16

Solução	Área (média)
	(240- 190 nm)
Se	468,35
Si	340,05
Sr	380,30

5 CONCLUSÕES

O fracionamento por espuma mostrou-se um processo simples e viável para ser utilizado como operação para concentração, separação e purificação de saponinas de soluções diluídas de extratos de quilaia, graças a atividade surfatante das saponinas, o processo não requer adição de reagentes que poderiam contaminar o produto final. O processo pode ser realizado a temperatura ambiente, evitando caramelizar os açúcares presentes e é uma operação de baixos custo e baixo consumo energético.

A redução do pH a uma concentrações inicial inferior a CMC, levou a formação de uma espuma mais estável e seca e o fornecimento de menor massa de espuma e maior razão entre o volume de solução inicial e espumado.

Observou-se que para uma vazão constante de nitrogênio, quanto maior a concentração da solução inicial, menor o volume da solução residual na coluna e maior o tempo de fracionamento.

O espumado retirou cerca de 28% de sólidos tensoativos do extrato original (saponinas e proteínas), nos ensaios a concentração abaixo da CMC em todos os pHs. A pH 3,0 esse comportamento também ocorre na CMC.

Nos três níveis de pHs estudados observou-se aumento entre 10 a 7 vezes na concentração de tensoativos na espuma em relação a concentração inicial de quilaia ao se usar soluções de quilaia com concentração inicial de 80 mg/L e entre 9 a 2 vezes para o fracionamento de soluções de quilaia com concentração inicial igual a CMC. Acima da CMC os resultados não foram satisfatórios devido ao arraste da solução inicial para a espuma, o que foi confirmado pelos espectros de absorção e pela porcentagem de massa seca de sólidos no espumado em relação a solução inicial.

O residuo final na operação por fracionamento por espuma de soluções com concentração inicial na CMC ou inferior são esgotados em tensoativos.

As curvas tensão superficial vs logaritmo da concentração do espumado e do extrato inicial indicam que o perfil de tensoativos e contaminantes é diferente nessas

soluções. Abaixo da CMC apenas a pH 3,0 foi possível calcular a CMC do espumado que foi menor que a do extrato inicial.

Os fracionamentos de soluções com concentrações abaixo da CMC geraram um espumado, que exibiu grande aumento de absorbância, na faixa [224- 205] de comprimento de onda do UV.

As condições de operação que favoreceram a concentração e purificação do extrato foram : pH 3,0 e concentração abaixo da CMC. O processo conduzido à pH 3,0 pode ter sido favorecido por ser um pH menor do que o pKa do ácido glucorônico que é em torno de 4,0 ocorrendo melhor empacotamento dos solutos tensoativos na interface.

O efeito de redução da concentração da Solução Inicial sobre o enriquecimento de surfatante mantendo-se constante o pH e a vazão de Solução Inicial pode ser entendido como o menor compartilhamento das moléculas pela interface gás – líquido. Diminuído essa concentração de quilaia na coluna de líquido, ocorre menor taxa de arrasto, maior diâmetro de bolhas, sendo menor a quantidade de tensoativos transferidos do seio do líquido para a interface; o leito de espuma gerado apresenta maiores taxas de drenagem e conseqüentemente maiores concentrações de surfatantes na espuma.

6.0 SUGESTÕES

1. Para dar continuidade ao trabalho de fracionamento de espuma sugere-se alguns ensaios complementares, se possível, devem usar o HPLC para a quantificação das saponinas:

- Ensaios com diferentes diâmetro de bolhas.
- Determinação da curva de equilíbrio de adsorção de saponinas de quilaia.
- Ensaios de fracionamento por espuma operando em regime contínuo diminuindo a necessidade de se fazer mais de um ensaio para coleta de material suficiente para análise.

2. Incorporar uma etapa de fracionamento por espuma na metodologia de remoção de colesterol por solubilização em micelas de saponina (Sundfeld, 1998).

- Recuperar saponinas através do fracionamento por espuma, do refino aquoso e da fase adsorvida na terra diatomácea com adsorção do complexo saponina-colesterol, na interface das bolhas e posterior quebra do complexo.
- Incorporar o fracionamento por espuma no próprio processo desenvolvido por Sundfeld (1998), substituindo a etapa de adsorção na terra diatomácea.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALLINGER, L.N. et al. *Química Orgânica*. Editora Guanabara Koogan S.A., 1986. cap.27, p. 673- 674.
- ANÔNIMO, Manual do Tensiômetro Kruss,1996.
- ARAÚJO, E.A.F, Relatório de Iniciação Científica, FAPESP(N^o 93/0622-6), 1997.
- ATKINS, P.W. *Physical Chemistry*. 4ed Oxford University, 1990. Cap. 23 p.708-709.
- ATTWOOD, D e FLORENCE, A.T. *Surfactant Systems - Their Chemistry, Pharmacy and Biology*. 2^a. ed. New York, London. Chapman and Hall, 1983. p. 73, 96, 388
- BEHBOUDI, S. MOREIN, B. e RÖNNBERG, B. Isolation and quantification of Quillaja saponaria Molina Saponins and lipids in iscom-matrix and iscoms. *Vaccine*, **13** (17):1690-1696,1995.
- BENJAMIN, H. e HAROLD, M.M.N *Cromatografia Líquida de Alta Presión*, Washington , 1973. (Monografia n^o10,The General Secretariat of the Organization of American States).
- BEREMAN, S. e EGLOFF, G. The physical chemistry of foams. *Chem. Revs*, **15**: 377, 1934.
- BERNARDO, R.R., PINTO, A.V. e PARENTE, J.P. Steroidal saponins from *Smilax officinalis* *Phytochemistry*, **43**,(2): 465- 469, 1996.
- CHIFFAUD, A structures physico-chimiques des milieux disperse. micelles, emulsion et microemulsions. *Journal de Chimie physique*, **80**,5407-413 1983.
- COOPERMAN, J.J. Foams and emulsion. (The Interface Symposium-6). **57**,(1): 56-62. 1963.
- DEBONO, J. e M. *Química de los Terpenos*. Monografía n^o34 Washington. Clayds 1992. p.3-9; p.16- 17, p.38,p.61, p.199 - 200,p.341 - 342.

- BOBBIO, F. O. e BOBBIO, P.A. Introdução a Química de Alimentos. 2ed. São Paulo, Livraria Varela, 1995. p. 127-133.
- BRUNHARA, S. S., BRUNS, R.E. e KIECKBUSCH, T.G. Otimização do Processo de Extração de Colesterol do Óleo de Manteiga Utilizando Extrato de *Quillaja Saponaria*. Anais do 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio de Janeiro, p. 791-796, 1996.
- BRUNNER, C.A. e D.G. STEPHAN, D.G. Foam fractionation. *Industrial Engineering Chemistry*, **57**, (5): 40, 1965.
- BURNOUF, M.R. e DELFEL, N.E. High performance liquid chromatography of triterpene saponins. *Journal of Chromatography*, **368**: 433-438, 1986.
- CAMBRIDGE BIOTECH. WORCESTER, MA, USA Soap compounds show promises as immunostimulants. *Biotechnology Newswatch*, p. 4. 1995.
- CASTELLAN., G.W. *Físico-Química, Fenômenos de Superfície*. Editora ao Livro Técnico, 1973. p. 449. Cap 18, nº 2.
- CFA (Indústria de tratamento de água e efluentes) Boletim de proposta técnica apresentado a industria cervejeira, São Paulo, 1998.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. e BONATO, P. Introdução a Métodos Cromatográficos 6ed. Campinas, Editora Unicamp, 1995. p. 143.
- CURL, C.L., PRINCE, K.R. e G.R. FENWICK The quantitative estimation of saponins in pea (*Pisum sativum L.*) and soya (*Glycinemax*) *Food Chemistry*, **18**, 241-250, 1985.
- DINESH, R. e BORIES, G. Simple gas chromatographic method for the determination of medicagenic acid in alfafa (*Medicago Sativa*). *Journal of Chromatography*, **410**: 1987, 169-175, 1987.
- EGLERT, J, WENIGER, B., LOBSTEIN, A. E ANTON, R. Triterpenoid saponins from *Mimosa Pigra*. *Journal of Natural Products*, **58**: (8), 1265- 1269, 1995.
- FOULK, C.W. E MILLER, J.N. Experimental Evidence in Support of the Balanced-Layers Theory of Liquid Foam Formation *Industrial and Engineering Chemistry*. **23**(11):1283-1288, 1931.
- FRIDRIKSBERG. D.A. *A Course in Colloud Chemistry*,. Moscou, Mir Publischers, 1986. p. 354-363. Chapther 17 Sistems Miceliar.

- GEBARA, V.C.B.C, PETRICEVICH, V.L., RAW, I. e SILVA, W.D.. Effect of saponinn from *Quillaja saponaria molina* on antibody, tumour necrosis factor abd interferon- γ production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **21**: 31-37, 1995.
- GEORGE, A.J. Legal status and toxicity of saponins. *Food Cosmet. Toxicol.*, **3**: 85-91, 1965.
- GESHTTNER, B., BIRK, Y e BONDI, A. Soybean saponins- VII. A method for the determination of sapogenin and saponin content in soya beans. *Phytochemistry*, **5**: 803-806, 1966.
- GOSMANN, G. e GUILLAUME, D. Triterpenoid saponin from *Ilex Paraguariensis*. *Journal of Natural Products*, **58**(3):438-441, 1995.
- GRASSI, D.N. PEREIRA F^o, R.G.P. E KIECKBUSCH, T.G. Avaliação dos Princípios Amargos Residuais no Óleo de Manteiga Processado com quillaja saponaria. Anais do 11^o Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio de Janeiro, p. 797-803, 1996.
- GRIEVE, M. Soap Tree. Botanical A Modern Herbal, (Internet) [http:// www.botanical.com/botanical/mgmh/s/soaptr60.html](http://www.botanical.com/botanical/mgmh/s/soaptr60.html), 1998
- HEINZMANN M. e SCHENKEL, E.P. Saponins from *Ilex Dumosa*. *Journal of Natural*, **58** (9):1419-1422, 1995.
- HIGUCHI, R., TOKIMITSU, Y.U., FUJIOKA, T., KOMORI, T. KAWASAKI, T. e OAKENFUL, D.G. Structure of desacylasaponins obtainer from the bark of *Quillaja Saponaria*. *Phytochemistry*, **26**: 229-235, 1987.
- HOUGH, J.S. Biotecnologia de la Cerveza y de la malta. Zaragoza Espanha, Editorial Acribia, S.A. 1960 p. 162-163.
- IGB F.G. OLESZEC, W. e JUROZYSTA, M. Vernoniosides and, two novel saponins from *Vernonia amygdalina*. *Journal of Natural Products*, **58**, (9):1438- 1443, 1995.
- IRLE AND P.A. e DZIEDZIC, S.Z. Soybean sapogenins by High- Performance Liquid Chromatography.. *Journal of Chromatography* **325**:. 275-281 1985
- IRLE AND, P.A., DZIEDZIC, S.Z. e KEARSLEY, M. W. Saponin content of soya and some commercial soya products by means of High- performance Liquid chromatography of the sapogenins.. *J. Sci. Food Agric* **37**: 694- 698, 1986.

- JAKOBI, W.M.WOODCOCK, K.E. e GROVE, C.S. (JR) Theoretical investigations of foam drainage. *Industrial and Engineering Chemistry*, **48**(11) 2046- 2045, 1956.
- KAIAZUKA, H.; TAKAHASHI, K. High Performance Liquid Chromatograph System for a wide range of naturally occurring glycosides.. *Journal of Chromatography* **258**:135-146, 1983.
- KALAC, P., PRICE, K.R. E FENWICK, G.R. Changes in Saponin content and composition during the ensilage of alfafa (*Medicago sativa L.*)_ *Food Chemistry*, **56**,(4):. 377-380,1996.
- KARGER, B.L, PONCHA, R.P e MILLER, M.M. Foam Fractionation under Total Reflux. *Analytical Chemistry*, **38**(6). 764-767, 1966.
- KASAI, R., YAMAGUCHI, H. e TANAKA, O. High Performance Liquid Chromatography of glicosides on new type de hydroxyapatite column. *Journal of Chromatography*, **407**: 205-210, 1987.
- KENSIL, C.R., PATEL, U., LENNICK, M. e MARCIANI, D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria Molina* cortex. *The Journal of Immunology*, **146**: (2)431-437, 1991.
- KAIAZUKA, H.; TAKAHASHI, K. High Performance Liquid Chromatograph System for a wide range of naturally occurring glycosides.. *Journal of Chromatography* **258**:135-146, 1983.
- KHALIL, A.H. e EL-ADAWY A. Isolation, identification and toxicity of saponin from different legumes. *Food Chemistry* **50**:197-201,1997.
- KICHENKO, A.,TARASENKO, V., GONCHARENKO, B. e GORBATKOV, V. Ways of Treating Conveying Wash waters of beet sugar refineries. *Chem. Abst.*, **88**: 1978.
- KIKUCHI, J., NAKAMURA, K.; NAKATA, O. e MORIKAWA, Y. Determination of monosacharies constituting the glicosides in saponins by high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **403**: 319-323, 1987.
- KIRK, R. e OTHMER, D.F. *The Interscience Encyclopedia*. New York,1954. p. 579, 586-587.
- KOZIOL, M. Afrosimetric estimation of threshold saponin concentration for bitterness in Quinoa (*Chenopodium quinoa wild*). *J. Sci. Food. Agric.*, **22**: 211-212, 1991.

- KUDOU, S., TONOMURA, M., TSUKAMOTO, C., UCHIDA, T., SAKIBE, T., TAMURA, N. e OKUIBO, K. Isolation and structural elucidation of DDMP conjugated soyasaponins as genuine saponins from soybean seeds. *Bioosci Biotech. Biochem.*, **57**: (4) 546- 550, 1993.
- LAMIDE, M., MARTIN, L.T., OLLIVIER, E., CRESPIE, M.F., NZE, E.L. e BALANSARD, G.. Separation of Saponins and Determination of Quinovic Acid 3-O- α - L Rhamnopyranoside from *Nauclea diderrichi* (dewild) Merr. Bark by High Performance Liquid Chromatograph. *Chromatography* **41**: (9), 1995.
- LARDET, D e THOMALLA, M. Synthèse organique et réactivité chimique en milieu micellaire et microémulsionné. I. Physicochimie *Bulletin de la Société Chimique de France*, **13**, 524-526, 1988.
- LEMLICH, R. Adsorptive Bubble Separation Methods, *Industrial and Engineering Chemistry*, **60**: (10) 17-28, 1968.
- LEUNG, A.Y. Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in Food, Drugs, and Cosmetics. New York, John Wiley, 1980. p. 276-277
- LUCENA, S.L. Efeito do Refluxo Externo no Fracionamento de Soluções Diluídas de Proteínas em Colunas de Bolhas e Espuma, Campinas, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 1995 (Tese de Mestrado).
- MAHRAJ, I., FROH, K.J e CAMPBELL, J.B. Immune responses of mice to inactivated rabies vaccine administered orally: potentiation by Quillaja saponin. *Can. J. Microbiol.* **32**: 414- 420, 1986.
- MALLEVIALLE, J; MIETTON, M. TAUZIN, C., ROUSTAN, M. e ROQUES, H. Applications of the bubble fractionation to water and wastewater treatment. *Progress- in- Water-Technology*, **12** (6): 37-46, 1980.
- MASSIEU, G., LAVAUD, C., BENKHALED, M. e OLIVER, L.L. Soyasaponin VI, a new maltol conjugate from alfalfa and soybean. *Journal of Natural Products*, **55**: (9) 1339-1342, 1992.
- MICHEL, J.J. Behaviour of polymer-supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butteroil. *J. Agric. Food Chem.* **38**(9): 1839-1843, 1990.
- MICHEL, J.J., TOGLIA, E.A. e HOLSINGER, V.H. Polymer supported saponins as a procedure to cholesterol removal from butteroil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**(8) 1321- 1325, 1992.

- MIGUEL, M.H. Comunicação Pessoal, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, São Paulo 1997
- MIGUEL, M.H. Estudo do Sinergismo entre os tensoativos Aniônicos e Não Iônicos no fracionamento por espuma. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1987.. (Tese de Mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp. 1987.
- MILLER, C.A. e NEOGI, P. *Interfacial Phenomena- Equilibrium and Dynamic Effects Surfactant Science Series 17- IV- Surfactants* USA, Marcel Dekker, 1985. 141-155.
- MOHAN, S.B. e LYDDIAT, A. Protein separation by differential drainage from foam. *Journal Biotechnology and Bioengineering*, **44**:(10) 1261-1264.
- MOORE, W.J. *Físico Química* Cap. 11 Interfaces. 4ed. São Paulo, ed. Edgard Blucher LTDA, 1976. pg. 433 vl.2.
- MYSELS, K.J.; MUJERJEE, P. Reporting Experimental Datas Dealing With Critical Micellization Concentrations of aqueous surfactant systems. *Pure & Appl. Chem.*, Grã Bretanha, IUPAC, 51; 1083-1089, 1979.
- NAGASAKA, M. Effect of dosing Quillaia saponin on wastewater from edible meat industry. *Ibaraki Daigaku Kogakubu Kenkyu Shuho*, **43**: 97-103, 1995.
- NEUGEBAUER, J. *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry* Calbiochem Corp., 1988. 95p.
- NEWMAN, A. *A Chemistry of Terpenins and Terpenoids*, Londres, Academic Press, 1972. p. 1-3
- NG., K.G., PRICE, K.R. e FENWICK, G.R. A TLC method for the analysis of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Food Chemistry* **49**, p.311-315, 1994.
- OAKENFUL, D.G. e SIDHU, G.S. A physic-chemical explanation for the effects of dietary saponins on cholesterol and bile salt metabolism. *Nutr. Rep. Inter.*, **27**(6): 1253-1259, 1983.
- OAKENFUL, D.G, TOPPING, D.L ; ILLMAN, R.J; FENWICK, D.E. Prevention of dietary hypercholesterolaemia in the rat by soya bean and quillaja saponins. *Nutr. Rep. Intern.*, **29** (5): 1039-1046, 1984
- OAKENFUL, D. G. e SIDHU, G.S. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia. *European J. of Clinical Nutrition*, **44**: 79-88, 1990.

- OAKENFUL, D.G., Saponins in food – a review. *Food Chemistry*, **6**: 19–40, 1981
- OLIVEIRA, L.O. e KIECKBUSCH, T.G. Purificação de Saponinas de Quilaia para fins Alimentícios usando Fracionamento por Espuma. Anais do Congresso de Tecnologia de Alimentos 1996.
- PILLON, D.J. et al. Structure–function relationship among Quillaja Saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **85** (5): 518-526, 1996
- POTTER, S.M. et al.. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. *Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry*, **41**: 1287-1291, 1993.
- PRINCE, K.R. GRIFFITHS, N.M., CURL, C.L. e FENWICK, G.R. Undesirable Sensory Properties of the Dried Pea (*Pisum sativum*). The Role of Saponins. *Food Chemistry*, **17**: 105-115, 1985.
- PRINCE, K.R., JOHNSON, I.T. e FENWICK, G.R. The chemistry and biological significance of saponins in food and feedingstuffs. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **26** (1): 135, 1987.
- RABOCKAI, T. *Físico Química de Superfícies*. Washington, USA 1979. 3, 4p.
- RADOSEVICH, M.B. e DELFEL, N.E. High-performance liquid chromatograph of triterpene saponins. *Journal of Chromatography*, **368**: 433- 438, 1986.
- RAMOS, L. S., Interação de Detergentes Não-lônicos com a Membrana Eritrocitária : Estudo sobre a Ação dos Detergentes da Série Tween, Campinas, Instituto de Biologia UNICAMP, 1991 (Tese de mestrado).
- RAO, D. e BORIES, G. Simple gas chromatographic method for the determination of medicagenic acid in alfafa (*Medicago Sativa*). *Journal of Chromatography* **410**: 169-175, 1987.
- ROUHL, A.M. Saponins advances among those reported at Chicago ACS meeting – researchers unlocking potential of diverse, widely distributed saponins. *Chemical & Engineering News*. Setember 11, pg. 28-35, 1995.
- ROSA, P. F.V. Fracionamento de proteínas e outros tensoativos em colunas de bolhas e de espuma. Campinas, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 1996 (Tese de doutorado).
- ROUSSEAU, R. e GADEN (JR), E.L. *New Chemical Engineering Separation Techniques*, Capítulo 7, Foam separation – New York, USA, Interscience Publishers, 1962. p.319-385.

- RUIZ, R. G., PRINCE, K.R., ROSE, M.E., RHODES, M.J.C. E FENWICK, G. R.. Determination of saponins in Lupin Seed (*Lupinus Angustifolius*) using High – Performance Liquid Chromatography: comparison with a gas chromatographic method. *Journal of Liquid Chromatography*, **18**, (14) 2843-2853, 1995.
- RUIZ, W.A. Estudo Cromatográfico das Saponinas de Quinoa *Chenopodium Quinoa Wild*. Campinas, Instituto de Química, UNICAMP, 1979. (Tese de mestrado).
- SAMUKAWA, K., YAMASHITA, H., MATSSUDA, H. e KUBO, M. Simultaneous analysis of ginsenosides of various Ginseng Radex by HPLC, *Chem. Pharm. Bul.* **43** (1):137,1995.
- SANTANA, C.C. Adsorptive Bubble Separation Process as a Mean of Reducing Surface Active contaminants in Industrial wastewates. Notas de Aula, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Brasil, 1995.
- SANTANA, C.C. Um método simplificado para cálculo da depleção de tensoativos e de proteínas em águas residuais e caldos diluídos de fermentação com utilização de coluna de bolhas. *Revista Brasileira de Engenharia Química* , **17**(2): 21-23, 1997.
- SCAMEHORN, J.F., THARAPIWATTANANON, N. OSUWAN, S.; HARWELL, J.H e HALLER, K.J. Surfactant Recovery from Water Using Foam Fractionation. *Sep. Sci. Technol.*, **31**(9):1233- 1258, 1996.
- SCHÖPKE, T.H.; BARTLAKOWSKI, J. e HILLER, K. Critical Micellar Concentrations of a Number of Triterpenoid Saponins of Different Structure Types. *Pharmazie*, **50**, 771, 1995.
- SCHWARTZ, D.P, BREWINGTON, C.R. e BURGWARD, L.W. Rapid Quantitative Procedure for Removing Cholesterol from Butterfat. *J. Lipid Research*. **8**: 54-59, 1967
- SCHWUEGER e BARTNIK. Biochemistry, toxicology, Dermatology. Surfactants Science Series , New York, USA, Edit: Christiam Goxhuber, 1980.
- SELOR, T. Comunicação Pessoal, Laboratório de Microbiologia, FEA, UNICAMP, 1996.
- SHIMIZU, K., AMAGAYA, S. e OGIARA, Y. Separation and quantitative analysis of saikosaponins by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatograph*, 268 pg.86-91 1983.

- SIDHU, G.S e OAKENFUL, D.G A Mechanism for the Hypocholesterolaemic Activity of Saponins. *British J. of Nutrition*, **55**: 643-649, 1986.
- SIGMA PRODUCT INFORMATION (Org) Saponin from Quillaja Bark, (Internet) [http:// www. Sigma.sial.com/sigma/proddata/s7900.htm](http://www.Sigma.sial.com/sigma/proddata/s7900.htm), 1998
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, C.G. e MORRIL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 3 ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, , pg. 203, 206.
- SKOOG, D.A. E LEARY, J.J. *Principles of Instrumental Analysis*. 4ed Florida, USA, Saudes College, 1992. p.124-126.
- SO, H.S., YOON, H.S., KWON, Y.S. e CHO, J.M. Quillaja saponin adjuvant and vaccine formulation containing it. 13 abril 1995 (Lg Chemical Ltda., S. Korea) Patente
- SOEDER, C.J., PAPADEROS, A., KLEESPIES, M., KNEIFEL, H., HAEGEL, F.H. e Webb, L. Influence of phytogenic surfactants (quilaya saponin and soya lecithin) on bio elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 654-659, 1996.
- SOUZA, A. H. Occurrence of toxics saponins in soft drinks. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*; **4** (109): 13,18, 1969.
- SPARNAAY, M.J. *The international Encyclopedia of Physical and Chemical Physics*, 4. Topic 14 Properties of Interfaces- Cap 5 Surfactants- USA, Pergamon Press, 1972. P. 205-208
- SPEMBER, R.M. New technologies for Cholesterol Reduction. *Food Process*, **50** (12): 154- 160, 1989.
- STOICA, L. e CATUNEANU, R. Flotation-separation of the surfactants in waste water. *Revista de Chimie (Bukarest)* **43**: 36-41, 1992.
- SUNDELL, D.E. Separation of cholesterol from butteroil by tretment with quilaia saponin solution and diatomaceous earth. Universidade da California- Davis, CA, USA; 1992. (Tese de Mestrado). 151p.
- SUNDELL, D. E. Separação de colesterol do óleo de manteiga utilizando extratos de *Quillaja Saponaria Molina*. Relatório para obtenção dos créditos referentes à disciplina Metodologia de pesquisa sob a orientação do Prof. Mauro J.A. Tereso.

- SUNDFELD, E. Separação de Colesterol do Óleo de Manteiga utilizando Extratos de *Quillaja Saponaria Molina* Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998 (Tese de doutorado).
- TANAKA, M. LI- FANG; I. ISHIZAKI; S. e TAGUCHI, T. Interaction saponins with salt soluble protein from Walleye pollack meat. *Fisheries.Science*, **61** (2): 373-374, 1995.
- TASHIRO, E. Biological treatment of sewage effluents using saponins containg agents. Jpn Kokai Tokkyo Koho Jp. 19 dezembro Heisei, 1995
- TOPPING, D.L., ILLMAN, R.J, FENWICK,D.E. e OAKENFULL, D.G. et al. Effects of quillaja and saponins on plasma cholesterol and faecal steroid excretion in the rat. *Proc Nutr. Soc; Aust.* **5** : 195, 1980.
- VAN ATTA, G.R., GUGGOLZ, J e THOMPSON, C.R. Determination of saponins in alfafa . *Agricultural and Food Chemistry*, **9**(1): 1961
- VARSHNEY, L.P., BEG, M.F.A. e SANKASRAM, A.V.B .Saponins and sapogenins from Quillaia Saponaria. *Fitoterapia.*, **56**:254, 1985
- WENNERSTROM, H. e LINDMAN, B., 1. *J. Phys.Chem.*, **23** :2931,1979.
- YAMAGUCHI H., MATSUURA, H., KASAI, R. MIZUTANI, K., FUJINO, H., OHTANI, K., FUWA, T. e TANAKA, O...._Appllication of borate ion-exchange mode High Performance Liquid Chromatography to separation of glycosides: saponins of Ginseng, *Sapindus mukurossi* GAERTN. And *Anemone rivularis* BUCH- HAM. *Chem. Pharm., Bull.* **34**(7): 2859-2867, 1986.

APÊNDICE A

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA

Os dados para construção da Tabela 4.1 são listados nas Tabelas A1 e A2. As medidas da Tensão Superficial obtidas pelo tensiômetro Kruss encontram-se na Tabela A1. As medidas obtidas com o tensiômetro K5V encontram-se na Tabela A2. Os gráficos referentes a cada metodologia são apresentados nas Figuras A1, A2, A3, A4, A5. Os gráficos são apresentados em escala linear, Tensão Superficial vs $\log(C)$. Sendo que C encontra-se em g/ml. A interseção das duas retas forneceu o valor correspondente ao $\log(CMC)$. Nos gráficos são apresentados as equações das retas inferior e superior. As primeiras medidas que originaram a Tabela 4.1 serviram para a escolha da melhor metodologia e equipamento para leitura da Tensão superficial e para construção da Curva padrão nos pHs 3,0, 5,0 e 7,0.

Tabela A1 Tensão Superficial (ver Tabela 4.1) de soluções de quilaia, pH 3,0, Tensiômetro Kruss .

Concentração mg/L	Tensões superficiais (mN/m)		
	Metodologia 1	Metodologia 2a	Metodologia 2b
0.2	52.74	65.62	73.25
0.6	55.10	60.66	61.20
2	51.61	47.05	48.21
4	55.46	46.65	53.25
8	44.87	45.67	47.83
20	44.06	41.57	41.97
40	42.44	40.30	40.72
80	38.81	38.2	38.77
400	38.07	38.25	38.87
800	38.49	38,85	38.29
8000	38.25	38.76	39.56
20000	39.54	39.37	40.00
Água destilada: 73.35; água desionizada 73,67			

Tabela A2 . Tensão Superficial de soluções de quilaia, pH 3,0, Tensiômetro K5V

Concentração	Tensões superficiais lidas no Tensiômetro K5v	
	Metodologia 3a	Metodologia 3b
mg/L		
0.2	65.05	59.34
0.6	59.01	54.42
2	62.65	58.50
4	69.06	59.57
8	51.20	47.61
20	44.85	43.11
40	41.10	39.96
80	38.44	37.78
400	37.15	38.83
800	38.01	36.09
8000	36.22	36.07
20000	36.36	35.49

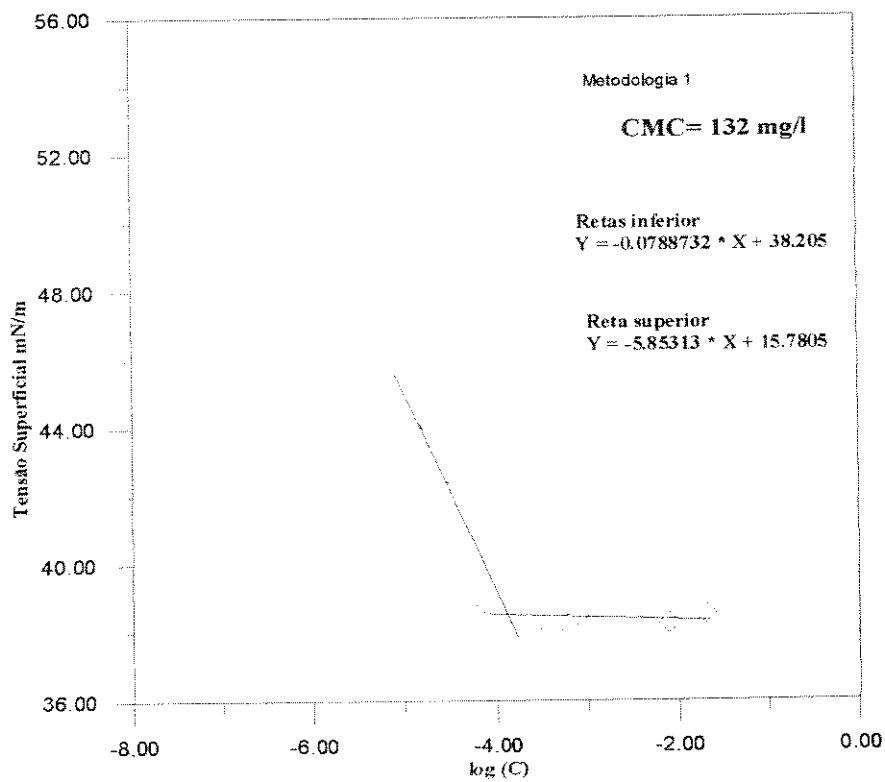


Figura A1 Tensão superficial vs log (C) (Metodologia 1)

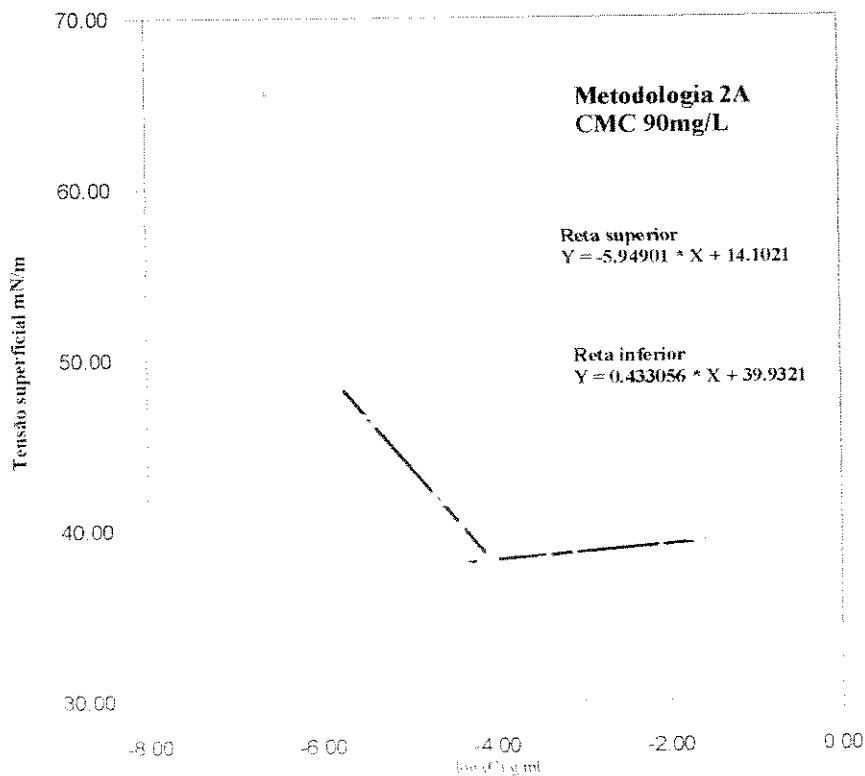


Figura A2 Tensão superficial vs log (C) (Metodologia 2A)

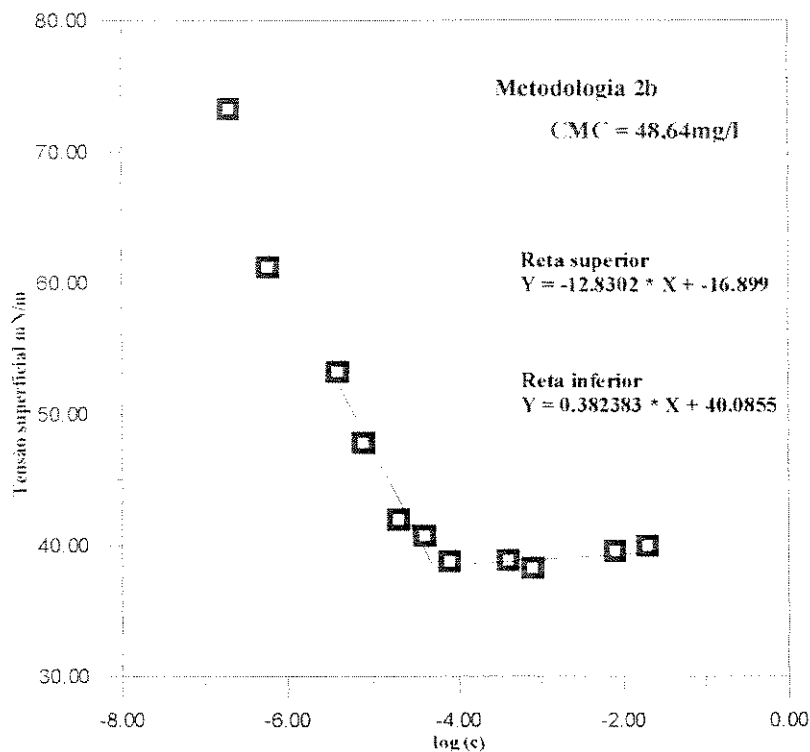


Figura A3 Tensão superficial vs log (C) (Metodologia 2B)

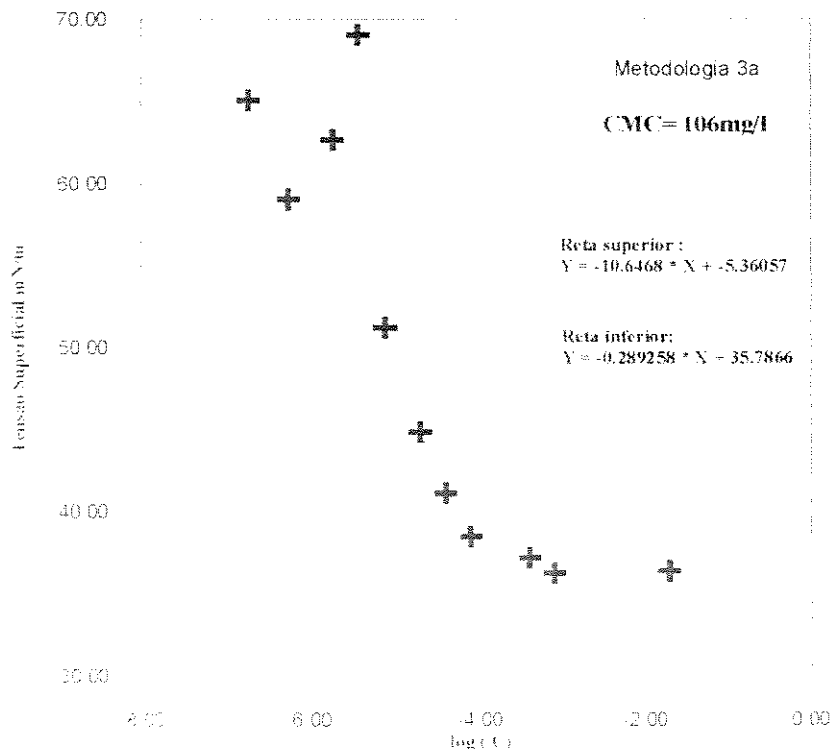


Figura A4 Tensão superficial vs log (C) (Metodologia 3A)

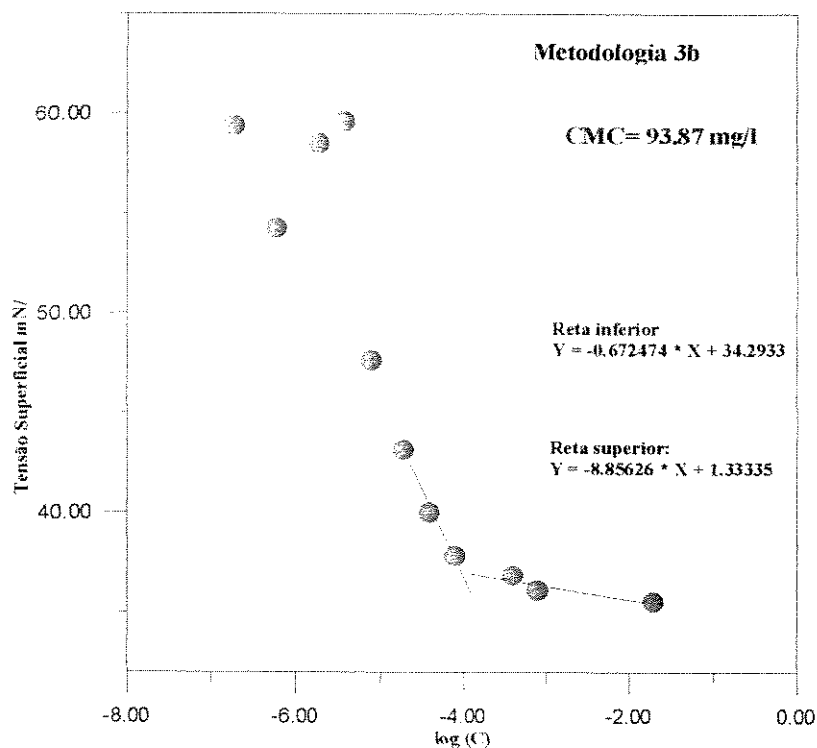


Figura A5 Tensão superficial vs log (C) (Metodologia 3B)

Nas figuras subsequentes são apresentadas as curvas da tensão superficial vs tempo. Estas medidas foram realizadas no Tensiômetro K5V

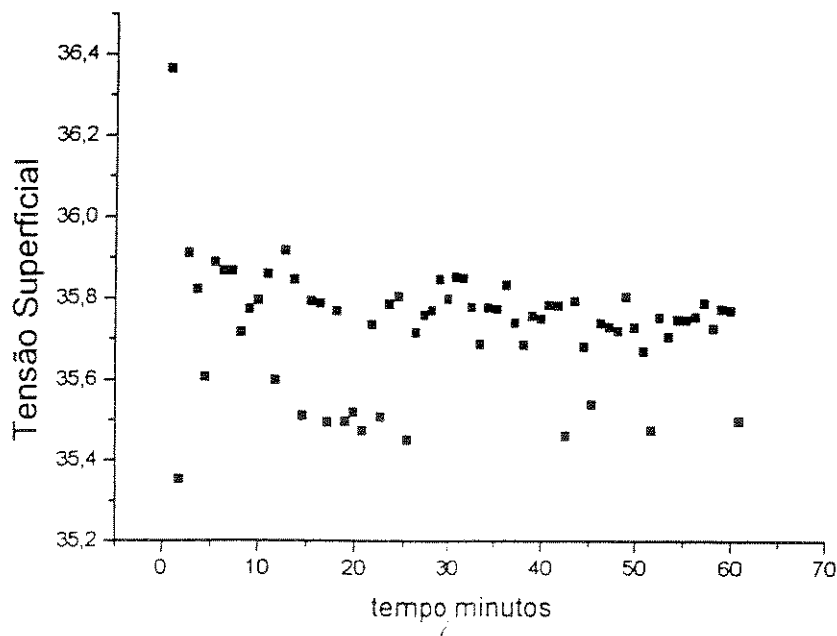


Figura A6 Tensão superficial vs tempo para concentração de 20000mg/l. (Tensiômetro K5V)

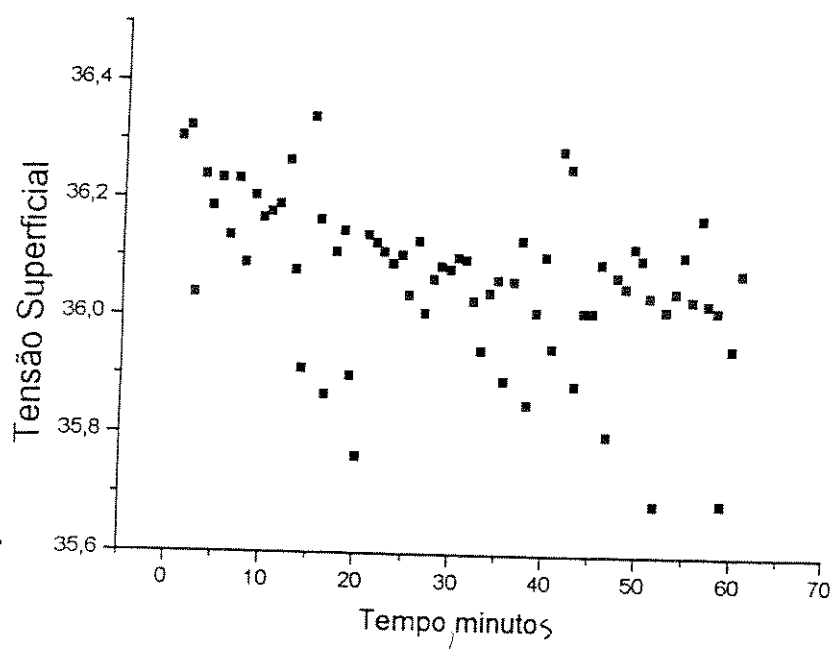


Figura A7 Tensão superficial vs tempo para concentração de 8000mg/L (Tensiômetro K5V)

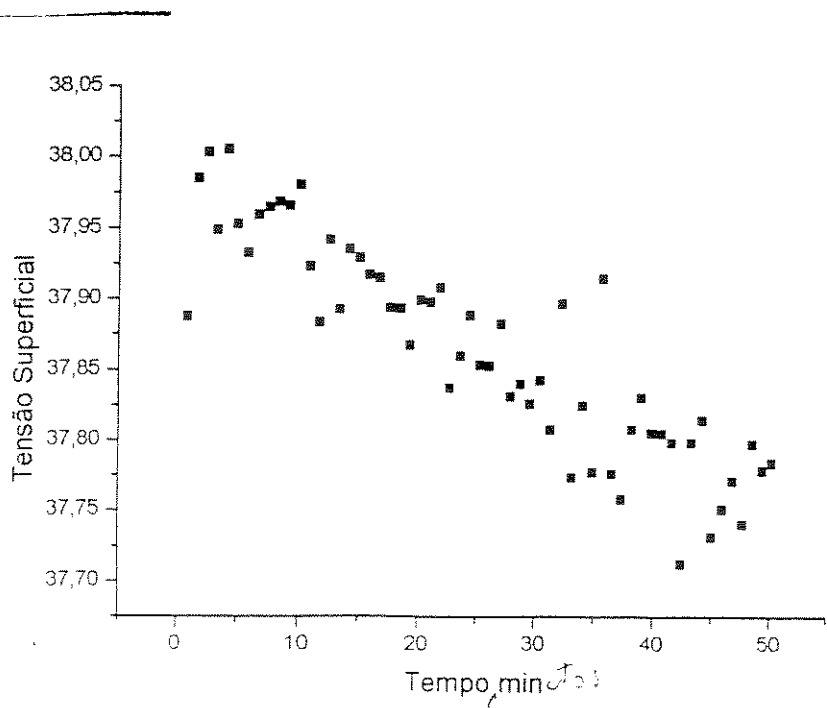


Figura A8 Tensão superficial vs tempo para concentração de 80mg/L (Tensiômetro K5V)

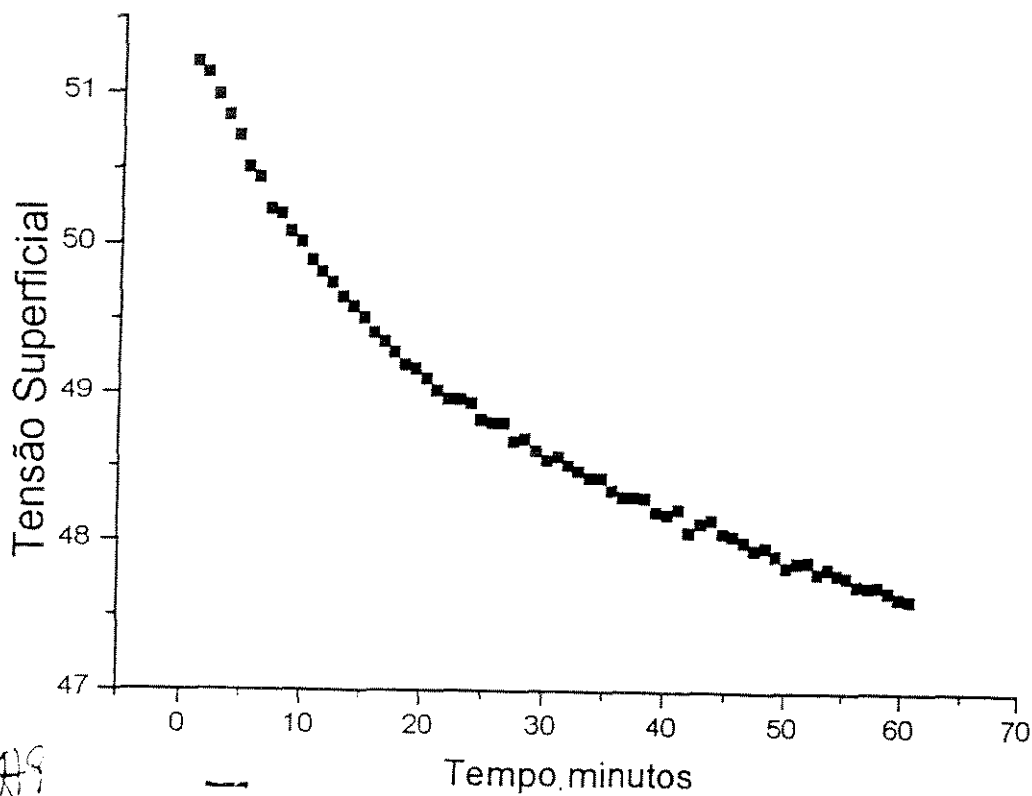


Figura A9 Tensão superficial vs tempo para concentração de 8mg/L (Tensiômetro K5V)

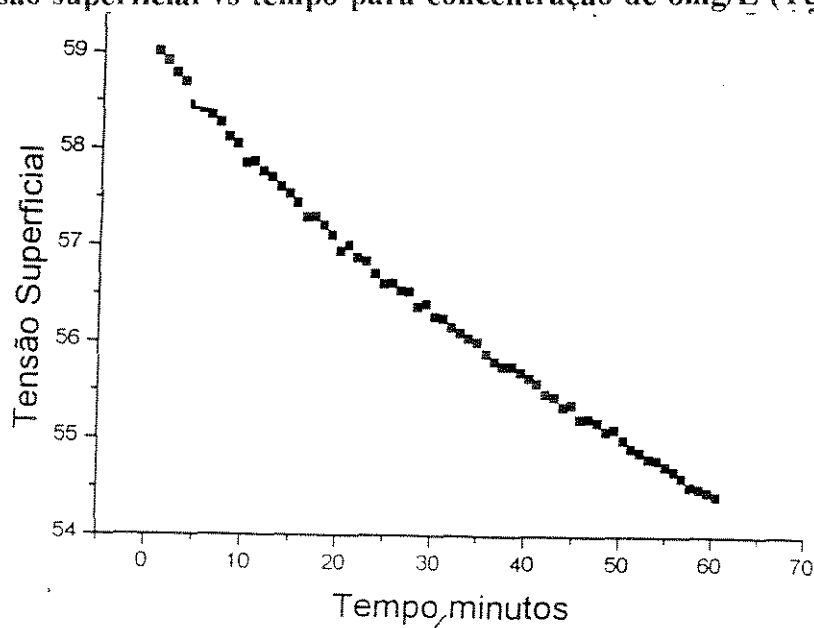


Figura A10 Tensão superficial vs tempo para concentração de 0,6mg/L (Tensiômetro K5V)

Observou-se um comportamento muito diferenciado entre as soluções de concentração abaixo de 40mg/L e acima de 80 mg/L, sendo que, apenas nessas últimas conseguiu-se obter um equilíbrio.

Baseando-se nos resultados encontrados, utilizou-se a metodologia de Sundfeld (1995) para leitura da tensão superficial das soluções de quilaia em três pHs (3,0, 5,0 e

7,0). A espuma formada acima da solução era retirada e efetuou-se dois ciclos de medidas e usou-se a média dos dois ciclos. Escolheu-se como pontos para traçar a reta superior aqueles bem próximo a região de descontinuidade como usado por Sundfeld (1995). As tabelas e os gráficos referentes aos dois ciclos encontrados são apresentados a seguir, e deram suporte para criação dos gráficos finais apresentados no Capítulo 4.

Tabela A3 Tensão superficial de soluções de quilaia, em pH 3,0

Concentração	log(C)	Tensão Superficial	Tensão Superficial	Tensão Superficial
		1º ciclo	2º ciclo	Média
mg/L	g/mL	mN/m	mN/m	mN/m
0,2	-6,69897	73,18	73,23	73,205
0,4	-6,39794	73,33	73,23	73,280
6	-6,22185	72,89	72,8	72,845
2	-5,69897	65,32	64,72	65,020
4	-5,39794	55,75	53,58	55,565
8	-5,09691	45,42	44,61	45,015
20	-4,69897	42,77	43,24	43,005
40	-4,39794	42,37	42,34	42,355
80	-4,09691	40,12	39,98	40,050
200	-3,69897	38,60	38,63	38,615
400	-3,39794	38,64	38,61	38,625
4000	-2,39794	39,08	38,88	38,980
8000	-2,09691	39,22	38,92	39,070
20000	-1,69897	39,62	39,42	39,520

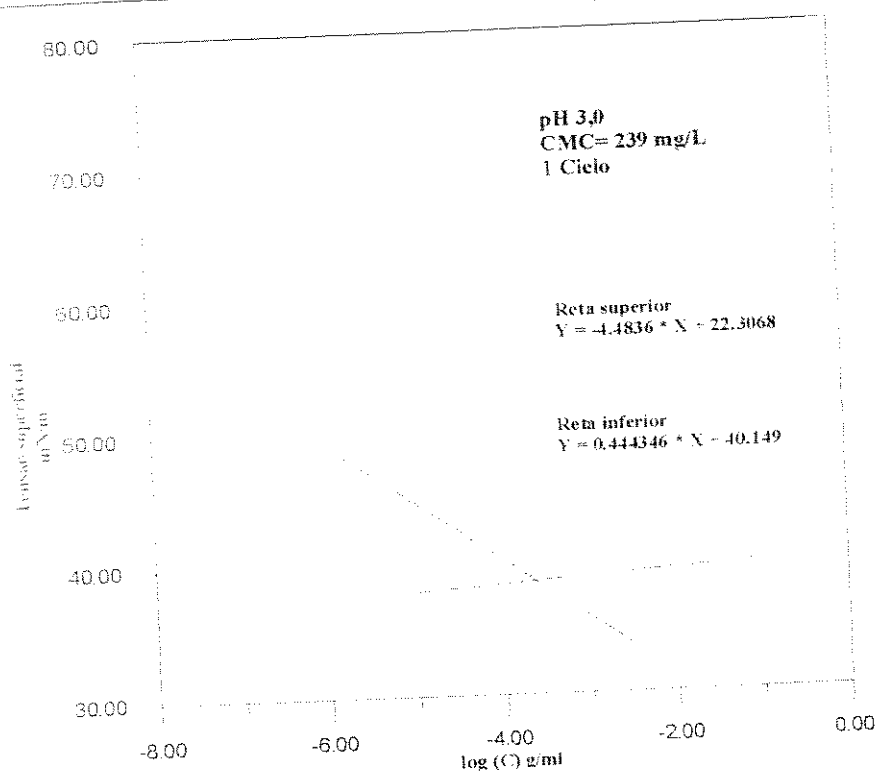


Figura A11 Variação da tensão superficial (1º ciclo) com a concentração de solução de quitina, pH 3,0

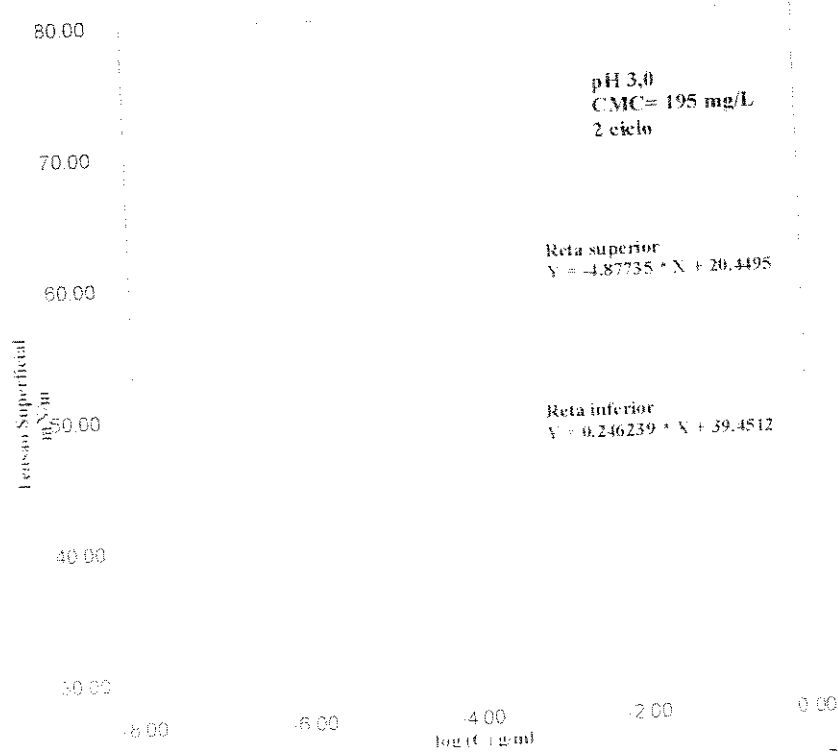


Figura A12 Variação da tensão superficial (2º ciclo) com a concentração de solução de quitina, pH 3,0

Tabela A4 Tensão superficial de solução de quilaia, em pH 5,0

Concentração	Log (C)	Tensão Superficial	Tensão Superficial	Tensão Superficial
		1º Ciclo	2º Ciclo	Média
mg/L	g/mL	mN/m	mN/m	mN/m
0,2	-6.69897	73.45	73.4	73.43
0,4	-6.39794	73.28	73.26	73.27
0,6	-6.22184	73.23	73.23	73.23
2	-5.69897	67.63	66.03	66.83
4	-5.39794	66.85	66.64	66.75
8	-5.09691	54.16	53.16	53.66
20	-4.69897	54.33	54.43	54.38
40	-4.39794	48.89	49.17	49.03
80	-4.09691	47.12	47.52	47.23
200	-3.69897	41.24	40.58	40.91
400	-3.39794	38.45	37.77	38.11
4000	-2.39794	38.2	38.17	38.19
20000	-1.69897	38.31	38.25	38.28

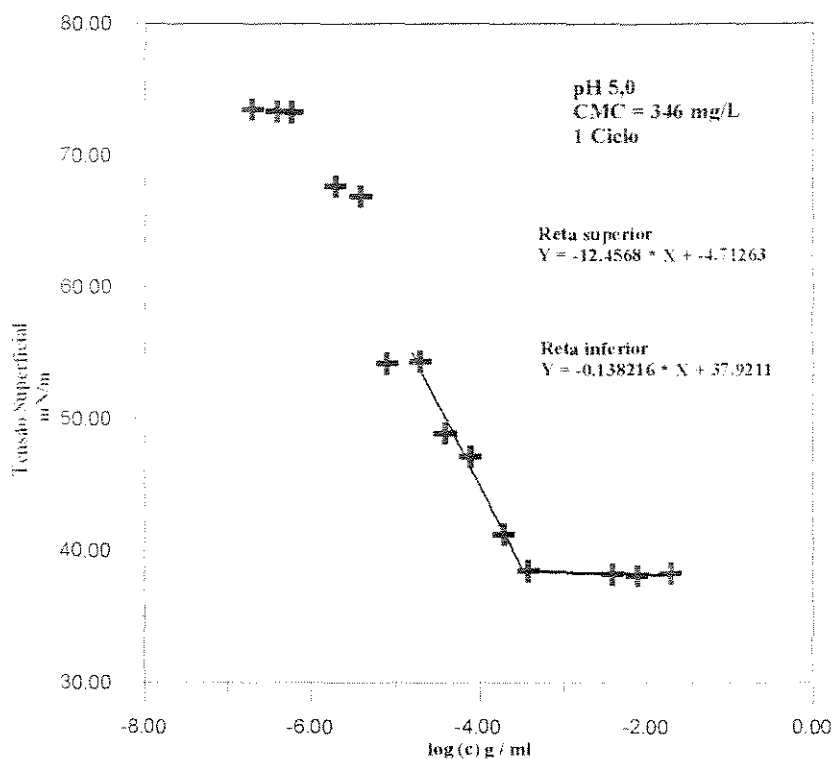


Figura A13 Variação da tensão superficial (1ºciclo) com a concentração de solução de quilaia, pH 5,0

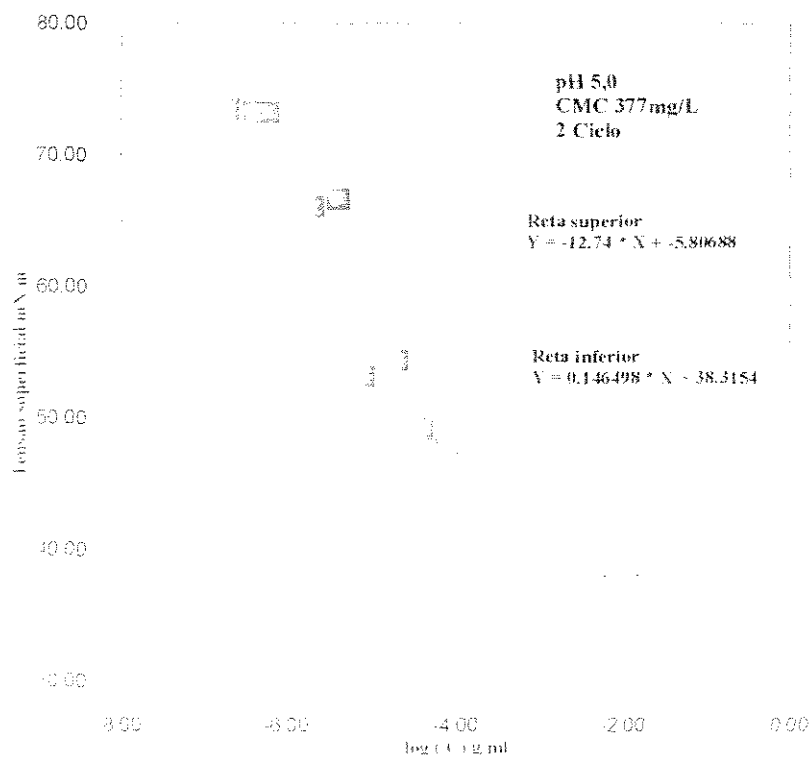


Figura A14 Variação da tensão superficial (2ºciclo) com a concentração de solução de quilaia, pH 5,0

Tabela A5 Tensão superficial de solução de quilaia, em pH 7,0

Concentração	Log (C)	Tensão Superficial	Tensão Superficial	Tensão Superficial
		1 ciclo	2 ciclo	Média
mg/L	g/mL	mN/m	mN/m	MN/m
0,4	-6,39794	73,04	73,04	73,04
0,6	-6,22185	73,15	73,11	73,13
2	-5,69897	72,6	71,86	72,23
4	-5,39794	66,32	65,38	65,85
8	-5,09691	58,86	61,36	60,11
20	-4,69897	52,17	51,61	51,89
40	-4,39794	48,92	47,13	48,025
200	-3,69897	42,21	41,51	41,86
400	-3,39794	39,23	38,91	39,07
8000	-2,09691	39,21	39,18	39,195
4000	-2,39794	39,37	39,05	39,21
20000	-1,69897	39,72	39,75	39,735

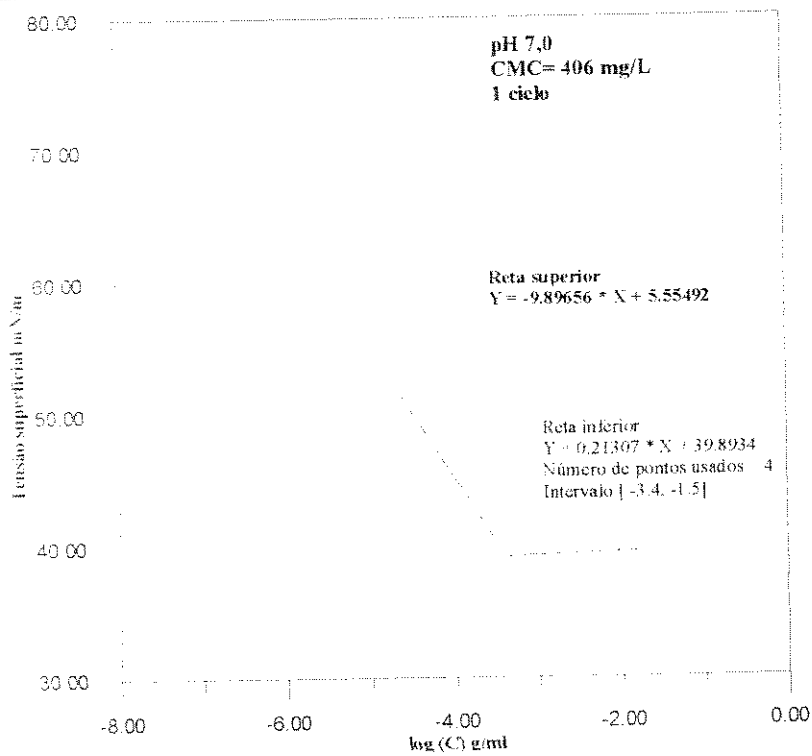


Figura A15 Variação da tensão superficial (1º Ciclo) com a concentração de solução de quilaia, pH 7.0.

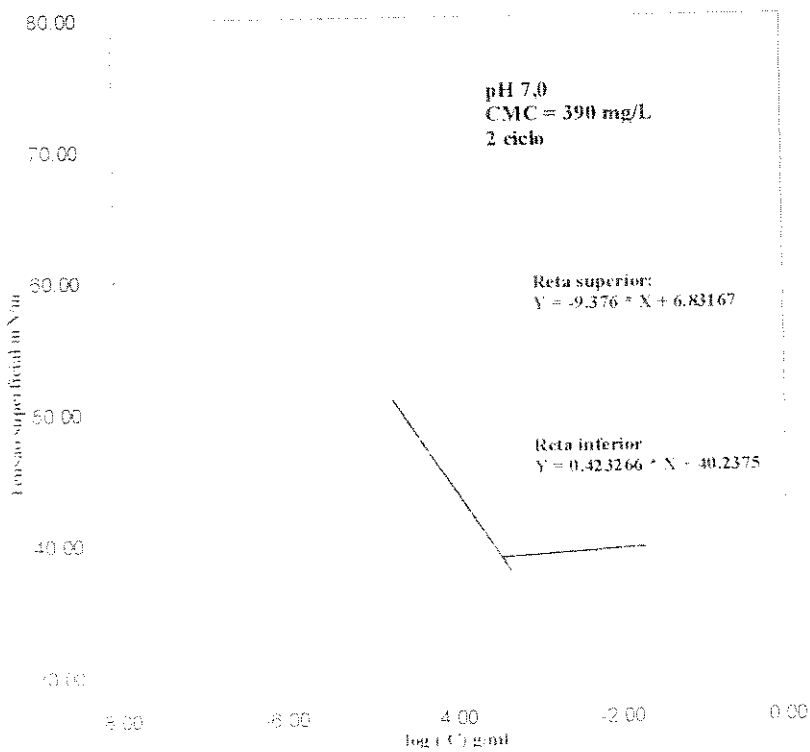


Figura A16 Variação da tensão superficial (2º Ciclo) com a concentração de solução de quilaia, pH 7.0.

APÊNDICE B

CALIBRAÇÃO DO ROTÂMETRO

Com a ajuda de um bolhometro e um cilindro de nitrogênio calibrou-se o rotâmetro Gilmont usado para medir a vazão de nitrogênio.

Abria-se a válvula e permitia-se a passagem do nitrogênio pelo rotâmetro e em seguida pelo bulhometro. A bolha de ar percorria um volume conhecido e o tempo gasto para percorrer este volume era cronometrado. Para cada leitura do rotâmetro foram efetuadas 10 medidas e a vazão volumétrica determinada para cada leitura foi a média das dez medidas. Os valores encontrados estão na Tabela B1.

Tabela B1: Pontos obtidos na calibração

eixo x:	eixo y
Leitura do rotâmetro	Vazão (mL/ min)
5	5,76
10	13,59
11	15,75
12	18,6
16	25,97
22	36,99
35	69,52
48	122,02
62	180,78
72	218,28
85	291,51
90	316,34

Estes dados foram ajustados por regressão linear, fornecendo a equação da reta da Figura B1 ou a leitura desejada fornecia o valor da vazão por Interpolação de Lagrange

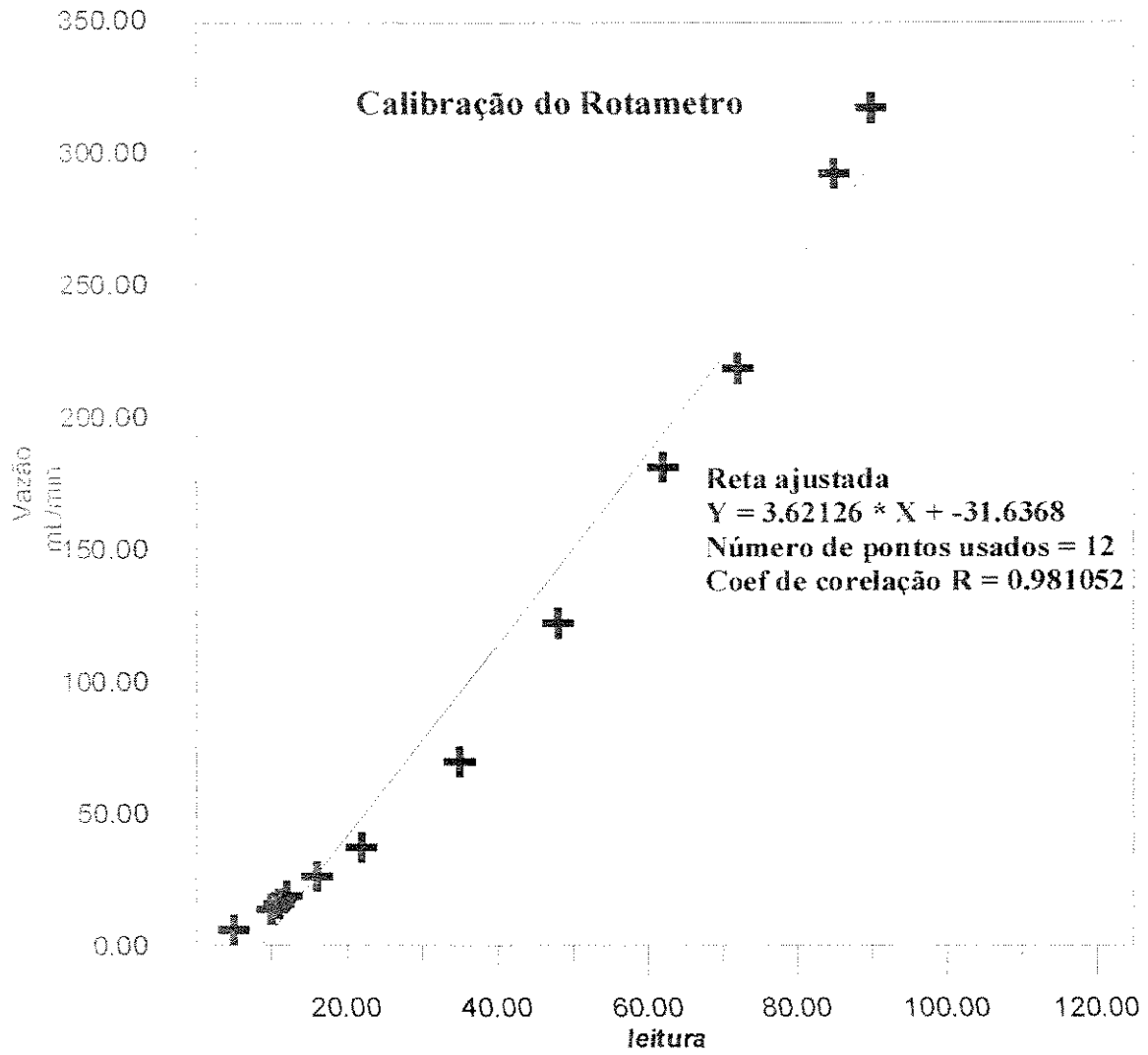


Figura B1 Curva de calibração do rotâmetro

APÊDICE C

MONITORIAMENTO DO PROCESSO POR HPLC

A técnica analítica HPLC de Grassi et al (1996) foi desenvolvida em conjunto com pesquisadores do Instituto de Química da Unicamp. O desenvolvimento da metodologia envolveu purificação em coluna de cromatografia líquida, cromatografia delgada e análise de identificação mais precisa por RMN13 (Ressonância Magnética de Carbono 13) e RMNH (Ressonância Magnética de prótons). O trabalho é complexo porque não existe padrão de saponinas para ser usado como referência. Uma varredura em espectrofotômetro indicou dois comprimentos de onda favoráveis: 230 e 312 nm. Esse último foi preferido por ter melhor resolução. Após testes com diferentes fases móveis estabeleceu-se as seguintes condições para a detecção do pico da saponina, que elue aproximadamente à 2,4 minutos: fase móvel Acetonitrila: H₂O (60: 40) em pH 3,0, comprimento de onda 312nm a uma vazão de 1 mL/min com coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2, C18 e volume de injeção 20µl .

A amostra era diluída de forma a se manter a proporção da fase móvel. Considerava-se que a amostra correspondia aos 40% de água e esta era diluída com 60% de acetonitrila.

Os resultados obtidos com injeção de amostras das soluções inicial, espumado e residuo são apresentados a seguir.

Quando o espumado foi recolhido em várias frações, as áreas do cromatograma correspondente são indicadas por E1, E2, E3 etc, conforme a sequência do recolhimento.

Os valores das áreas obtidas foram desconcertantes e contraditórios.

Os cromatogramas de alguns ensaios apresentaram áreas de Sr maior do que as que área de Se. Observou-se também que os picos maiores eluiam a 4,7 minutos e não a 2,4 minutos conforme Grassi et al (1996).

Nos Ensaios da Tabela C3 na maioria dos casos a área do espumado era menor que a da solução inicial.

Esse comportamento ficou melhor esclarecido quando se começou a fazer espectros de absorbância das fases e que indicaram claramente uma concentração no

espumado de princípios ativos de absorvância na faixa UV entre 190- 220 nm. A literatura mais recente confirma que saponinas tem picos de absorvância entre 200 e 210 nm (Lamidi et al, 1995; Ruiz et al., 1995 e Samukawa et al, 1995).

A análise de componentes a uma concentração próxima a CMC também é prejudicada pelas interações miceliares Araújo F^o (1996) mostrou que os extrato de saponina acima da CMC, não podia ser separado pela coluna fase reversa nas condições relatadas. Acima da CMC a amostra entra na coluna como um “pacote” de substâncias e sai da mesma forma, sem interação com a coluna, havendo visualização de apenas um pico. O mesmo não foi observado quando se tem uma solução abaixo da CMC onde outros componentes da mistura ficaram mais tempo retidos.

Um estudo específico sobre determinação de saponinas de quilaia pelo HPLC está em andamento no Laboratório de Engenharia de Processos (Endo, 1998). O trabalho parte do espumado obtido na coluna usada nesta tese e os resultados preliminares confirmam que o comprimento de onda mais indicado para a leitura da saponinas de quilaia é de 205nm. Até uma definição completa sobre o assunto, preferiu-se incluir as tabelas com os resultados obtidos.

Tabela C1 Leituras no HPLC das fases obtidas nos Ensaio correspondente à Tabela 3. 2

Ensaio	Área do Pico da Saponina por HPLC		
	Solução inicial	Espumado	Resíduo
B1	263 557	E1 283 604	257 656
		E2 248 107	
		E3 275 419	
		E4 474 274	
		E5 505 938	
B2	105 551	E1 180 585	109 690
		E2 186 036	
		E3 213 899	
B3	117 757	E1 182 379	122 196
		E2 186 036	
		E3 213 899	
B5	119 043	E1 168 847	111 845
		E3 270 419	
B7	53 629	E1 94 139	49 639
		E2 159 695	
		E3 113 520	
B9	----	E1 50 924	26 425
B11	----	45 341	21 274
B12	23 210	39 276	23 782
B13	22 605	35 092	22 381
B14	114 070	E1 226 478	102 415
		E2 131 488	
		E3 291 918	
B15	117 747	E1 151 990	109 671
		E2 176 398	
		E3 151 536	
B16	48 399	E1 84 708	47 123
		E2 159 695	
		E3 113 520	
B17	26 864	5 239	27 154
B19		E1 168 847	
		E3 270 419	
B20	----	E1 225 506	119 531
		E2 148 787	
		E3 829 502	
B21	117 682	E1 50 924	111 848
		E2 187 322	
		E3 541 851	
B22	----	E1 88 368	57 705
		E2 94 798	

Tabela C2 Leituras no HPLC das fases obtidas nos ensaios correspondente à Tabela 3.3

Ensaio	Área do Pico da Saponina HPLC		
	Inicial	Espumado	Resíduo
C1	250 717	E1 276 181	241 225
		E2 316 999	
		E3 320 366	
		E4 1 781 526	
C2	245 443	E1 342 510	203 027
		E2 379 995	
		E3 386 373	
C3	238 958	E1 472 876	225 802
		E2 312 359	
		E3 546 226	
		E4 328 019	
C4	236 245	E2 576 821	211 366
		E3 135 317	
		E4 1 561 001	
		E5 936 583	
C5	115 400	Presa	98 089
C6	110 953	453 831	106 613
C7	113 065	E1 317 461	112 491
		E2 180 224	
		E3 303 100	
C8	105 550	73 848	97 934
C9	55 729	E1 76 603	58 5333
		E2 78 713	
C10	57 318	E1 5 879	56 156
		E2 55 854	
		E3 103 575	
C11	251 526	E1 210 522	248 120
		E2 224 245	
		E3 214 705	
		E4 221 705	
		E5 236 650	
		E6 226 435	
		E7 372 942	
C12	252 615	E1 218 008	245 191
		E2 240 175	
		E3 270 609	
C13	122 173	E1 105 454	
		E2 105 067	
		E3 126 808	
		E4 1 063 466	
C14	122 403	E1 96 901	115 106
		E2 98 583	
		E3 121 131	

Tabela C3 Leituras no HPLC das fases obtidas no fracionamento por espuma numa coluna de 175 cm correspondendo aos Ensaio da Tabela 3.5 e 3.6

Concentração 400mg/L						
Ensaio	Volume de Si (ml)	pH	Área de Sa	Área de Se	Área de Sr	Massa de espuma (g)
D1	750	5,70(*)	116 827	E1 98.497	120 528	9,69
				E2 94.847		11,75
				E3 96.256		5,27
				E4 96.849		8,77
				E5 95.841		9,88
				E6 106. 453		11,53
				E7 106. 640		5,76
				E8 135.076		2,11
D2	500		121 474	E1 99.783	109.989	4,59
			114 397	E2 111. 396	106 991	5,65
				E3 94.894		7,23
				E4 102.008		8,84
				E5 98.646		6,26
				E6 163.012		2,14
D3	380		117 570	E1 90. 995	118 66	4,89
			110 796	E2 95.273	113 421	6,21
				E3 97.492		6,55
				E4 100. 597		6,45
				E5 171. 401		1,48
D4	300		114 724	E1 106 858	132 385	3,32
			116 762	E2 98 829	140 136	4,06
				E3 105. 852		4,99
				E4 115 447		3,35
				E5 224 979		0,91
E1	300	3	114 586	E1 135 495	109 244	2 42
			118 828	E2 104 024	105 671	3 41
				E3 107 235		2 89
				E4 158 714		2,13
E2	300	3	114 586	E1 96 709	99 595	3,04
			118 828	E2 88 4274	99 827	3, 94
				E3 120 551		3,72
				E4 100 990		2,93

APÊNDICE D

TANINOS INTERFERENTES PRESENTES NO EXTRATO DE QUILAIA

Taninos também são glicosídeos amplamente distribuídos em plantas. São substâncias não cristalinas, de cores que podem variar do branco ao marrom claro, e que formam soluções coloidais de sabor adstringente. Tem propriedade de precipitar proteínas e vários alcalóides em solução. Quimicamente os taninos são classificados em dois grupos principais, cujas estruturas são muito diferentes entre si, embora todos tenham em sua molécula os poli-hidroxifenóis ou seus derivados. Os pertencentes ao primeiro grupo são denominados taninos hidrolisáveis, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico, usados para curtimento de couro. O outro tipo encontrado em maior quantidade e de maior importância em alimentos são denominados taninos condensados. Tem estrutura semelhante aos flavanoídes, e por aquecimento com ácidos diluídos dão precipitados amorfos insolúveis em água, de cor variando do vermelho ao marrom (Bobbio e Bobbio, 1995).

Segundo Kirk e Othmer (1954) a cor de cada solução de tanino pode ser muito importante na sua identificação, o aumento do pH leva a oxidação de compostos e o escurecimento da solução de uma tonalidade laranja chegando até o preto. A taxa na qual o tanino é extraído de uma material é fortemente influenciada pela temperatura, tempo e volume de material na extração.

MEDIDAS DE ABSORBÂNCIA

Soluções aquosas de quilaia com concentração inicial de 80 mg/L foram fracionadas na coluna (terceira versão), obtendo-se as soluções Si, Se e Sr que foram submetidas a uma varredura em espectrofotômetro. Como resultado, obteve-se as leituras de Se, Sr e Si em espectros de absorção.

Uma solução de ácido tânico de 6 mg/L e uma solução aquosa de quilaia de 100 mg/L também tiveram seus espectros de absorção obtidos.

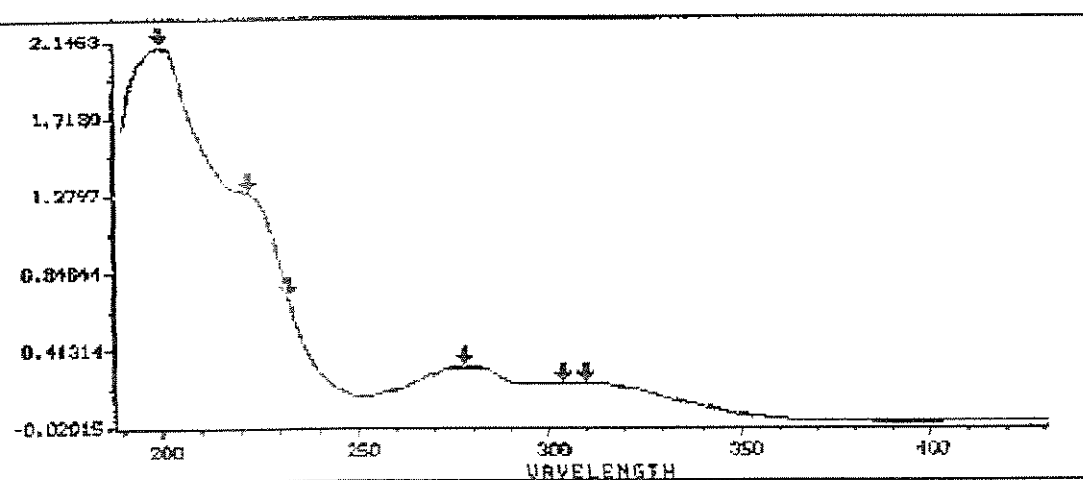
A acetonitrila foi o solvente preferido por ser transparente até o comprimento de onda de 189 nm.

Apesar da variação da diluição das amostras injetadas, os cromatogramas obtidos pela técnica de HPLC com (30/70 ACN/ Água) em pH = 3,0 não conseguiram reproduzir os picos obtidos para as soluções Si, Sr e Se pelas curvas de absorbância a 205- 220nm. Quando se obteve o mesmo comportamento dos cromatogramas que os encontrados pelas curvas de absorção não houve reprodutibilidade com a segunda injeção da amostra.

Após uma sequência laboriosa de ensaios com o HPLC - com a variação da procedência da acetonitrila utilizada, do ácido utilizado para acidificar a fase móvel, do regime isocrático e gradiente, da variação do comprimento de onda e da alteração da concentração de acetonitrila na fase móvel - na tentativa de se desenvolver uma técnica quantitativa para determinação da concentração das saponinas nas diversas fases envolvidas no fracionamento, adotou-se como caracterização das soluções as técnicas comentadas no Capítulo 3 em 3.2.5.4.

---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

le Name :	Register: A
Sample Name : saponina	Function : Absorbance
Solvent Name : agua	Wavelength Range : 190 to 820 nm
Concentration : 1.0000	Integration Time : 1 s
Units :	Std Deviation : Off



Marked Wavelengths

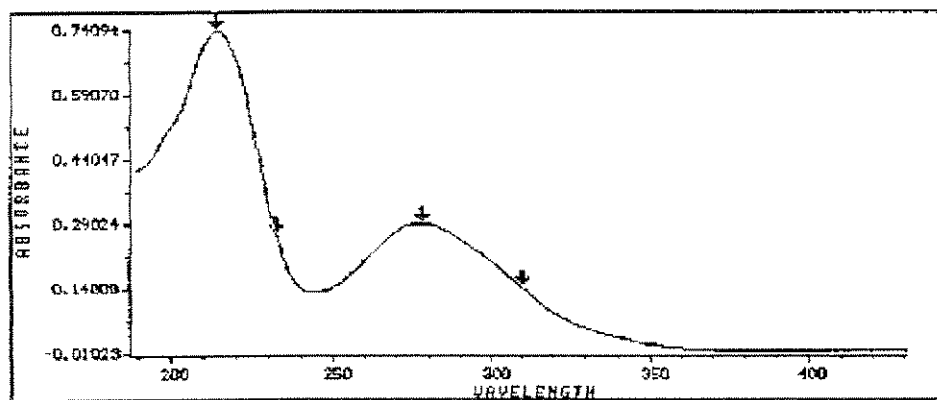
Reg A: L 273 =	0.31398
Reg A: L 304 =	0.21947
Reg A: L 222 =	1.27952
Reg A: L 200 =	2.1161
Reg A: L 232 =	0.70526
Reg A: L 310 =	0.32144

Figura D1 Absorbância do Extrato de Quilaia na concentração 100mg/L (branco água desionizada)

---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

File Name : Register: A

Sample Name : taninos Function : Absorbance
Solvent Name : agua Wavelength Range : 190 to 820 nm
Concentration : 1.0000 Integration Time : 1 s
Units : Std Deviation : Off



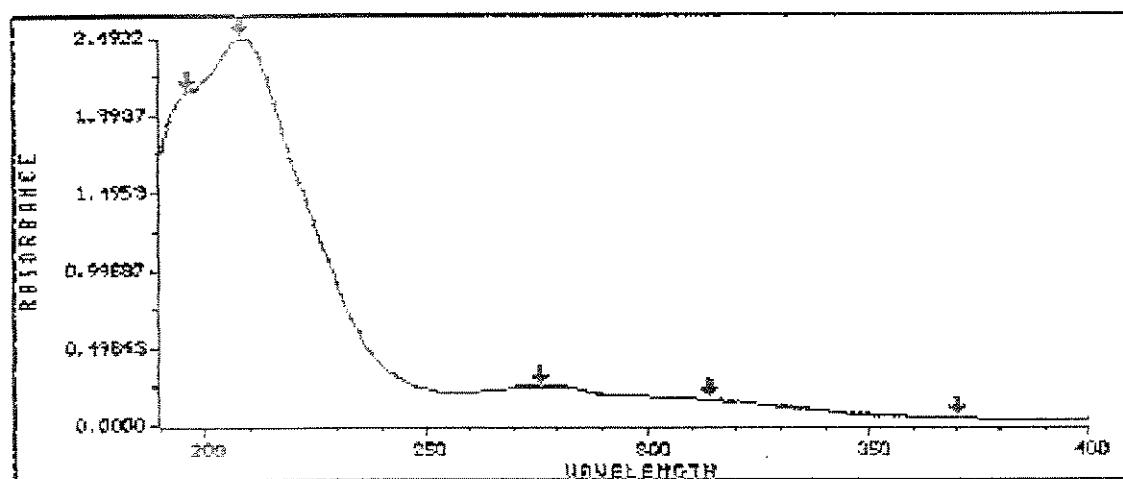
Marked Wavelengths

Reg A: L 310 = 0.14200
Reg A: L 278 = 0.29124
Reg A: L 232 = 0.26521
Reg A: L 214 = 0.74094

Figura D2 Absorbância da solução aquosa de ácido tânico na concentração 6mg/L
(branco água desionizada)

---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

File Name :	Register: A
Sample Name : A	Function : Absorbance
Solvent Name : AGUA	Wavelength Range : 190 to 820 nm
Concentration : 1.0000	Integration Time : 1 s
Units :	Std Deviation : Off



Marked Wavelengths

Reg A: L 276 = 0.25168
 Reg A: L 208 = 2.4922
 Reg A: L 196 = 2.1473
 Reg A: L 314 = 0.16731
 Reg A: L 370 = 0.04433

Figura D3 Absorbância do Espumado de uma solução de quilaia 80 mg/L (branco água desionizada)

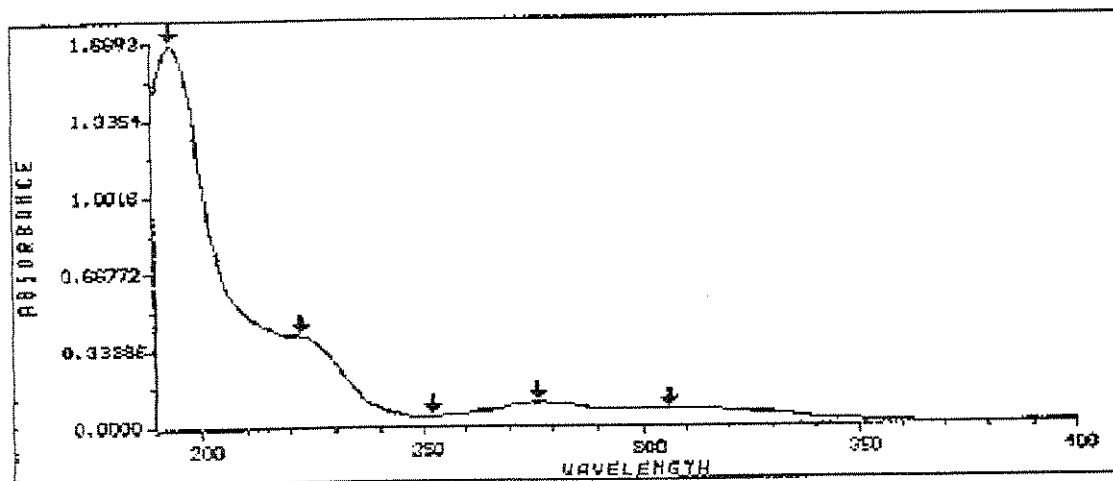
---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

File Name :

Register: A

Sample Name : B
Solvent Name : AGUA
Concentration : 1.0000
Units :

Function : Absorbance
Wavelength Range : 190 to 820 nm
Integration Time : 1 s
Std Deviation : Off



Marked Wavelengths

Reg A: L 276 = 0.09137
Reg A: L 222 = 0.39774
Reg A: L 252 = 0.04088
Reg A: L 306 = 0.06371
Reg A: L 194 = 1.6693

Figura D4 Absorbância da Solução de Quilaia, 80 mg/L (branco água desionizada)

---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

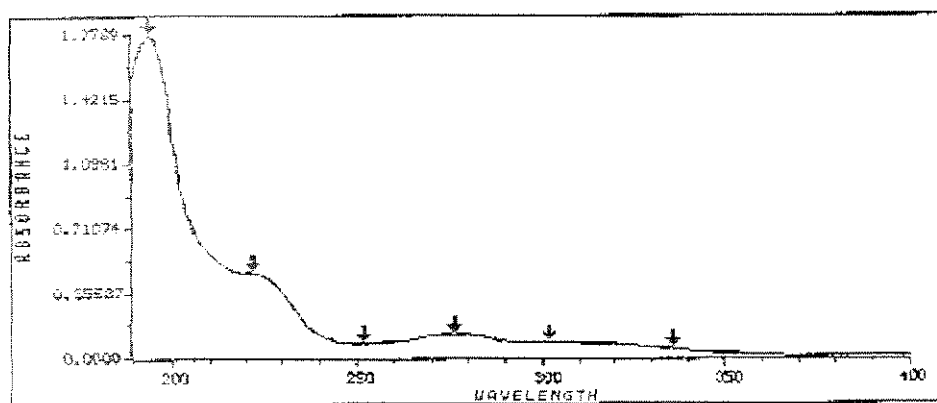
File Name : Register: A

Sample Name : C Function : Absorbance

Solvent Name : AGUA Wavelength Range : 190 to 820 nm

Concentration : 1.0000 Integration Time : 1 s

Units : Std Deviation : Off



Marked Wavelengths

Reg A: L 276 = 0.12631

Reg A: L 252 = 0.07756

Reg A: L 222 = 0.46445

Reg A: L 302 = 0.08235

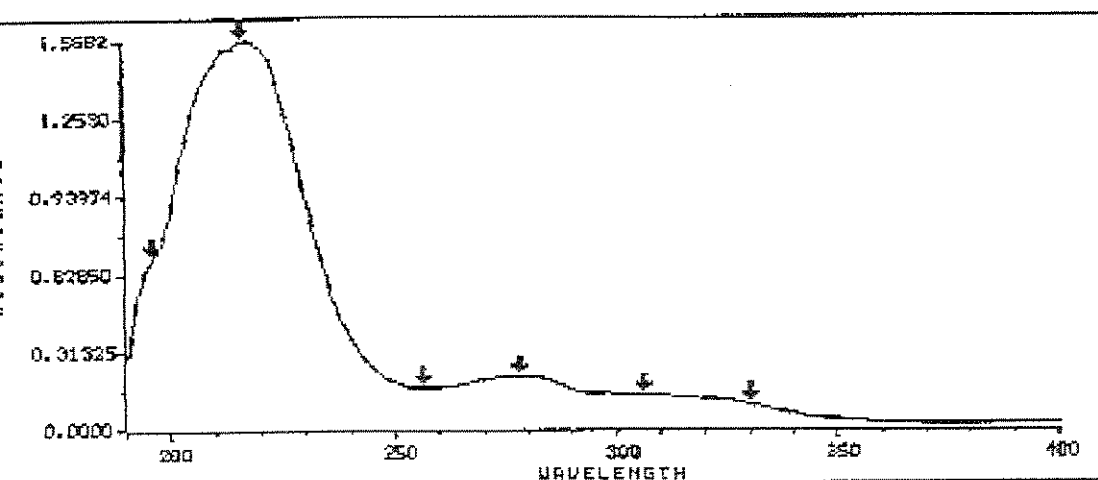
Reg A: L 336 = 0.04846

Reg A: L 194 = 1.7769

Figura D5 Absorbância da Solução Residual de um fracionamento em coluna de espuma de uma solução de quilia, 80 mg/L (branco: água desionizada)

---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

File Name :	Register: A
Sample Name : E	Function : Absorbance
Solvent Name : ACETONITRILA	Wavelength Range : 190 to 820 nm
Concentration : 1.0000	Integration Time : 1 s
Units :	Std Deviation : Off



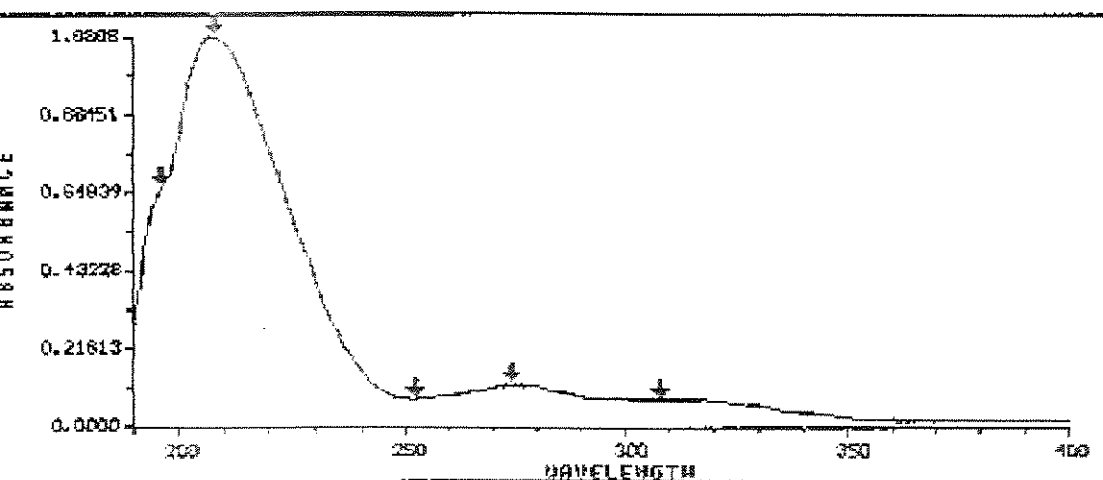
Marked Wavelengths

Reg A: L 278 =	0.21204
Reg A: L 306 =	0.13229
Reg A: L 330 =	0.09850
Reg A: L 256 =	0.16376
Reg A: L 216 =	1.5633
Reg A: L 196 =	0.69066

Figura D6 Absorbância do Espumado de uma solução de quilaia 80 mg/L (branco (ACN/Água : 30:70))

---> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

File Name :	Register: A
Sample Name : F	Function : Absorbance
Solvent Name : ACETONITRILA	Wavelength Range : 190 to 820 nm
Concentration : 1.0000	Integration Time : 1 s
Units :	Std Deviation : Off



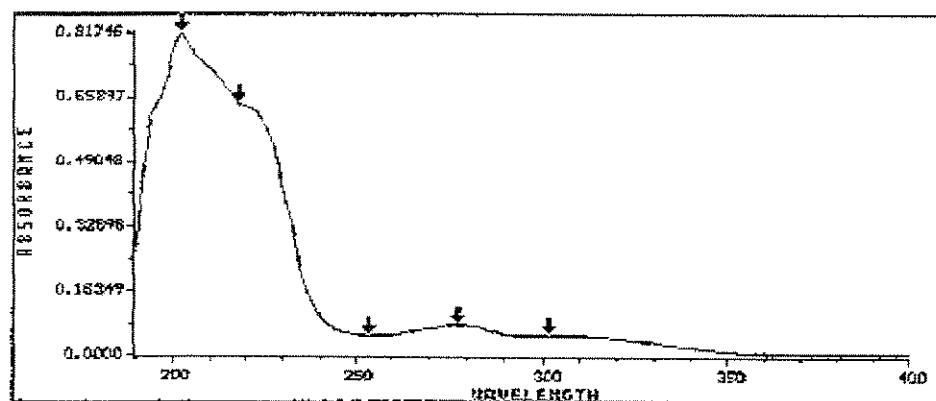
Marked Wavelengths

Reg A: L 274 =	0.11072
Reg A: L 308 =	0.07359
Reg A: L 252 =	0.07462
Reg A: L 208 =	1.0806
Reg A: L 196 =	0.66822

Figura D7 Absorbância da Solução ide quilaia, 80 mg/L (branco: (ACN/Água : 30:70))

----> WAVELENGTH SCAN REPORT <---

File Name : Register: A
Sample Name : G Function : Absorbance
Solvent Name : ACETONITRILA Wavelength Range : 190 to 820 nm
Concentration : 1.0000 Integration Time : 1 s
Units : Std Deviation : Off



Marked Wavelengths

Reg A: L 278 = 0.07681
Reg A: L 302 = 0.05086
Reg A: L 218 = 0.63924
Reg A: L 202 = 0.81746
Reg A: L 254 = 0.04903

Figura D8 Absorbância da Solução Residual de um fracionamento em coluna de espuma de uma solução de quilaia, 80 mg/L (branco ACN/Água (30:70))

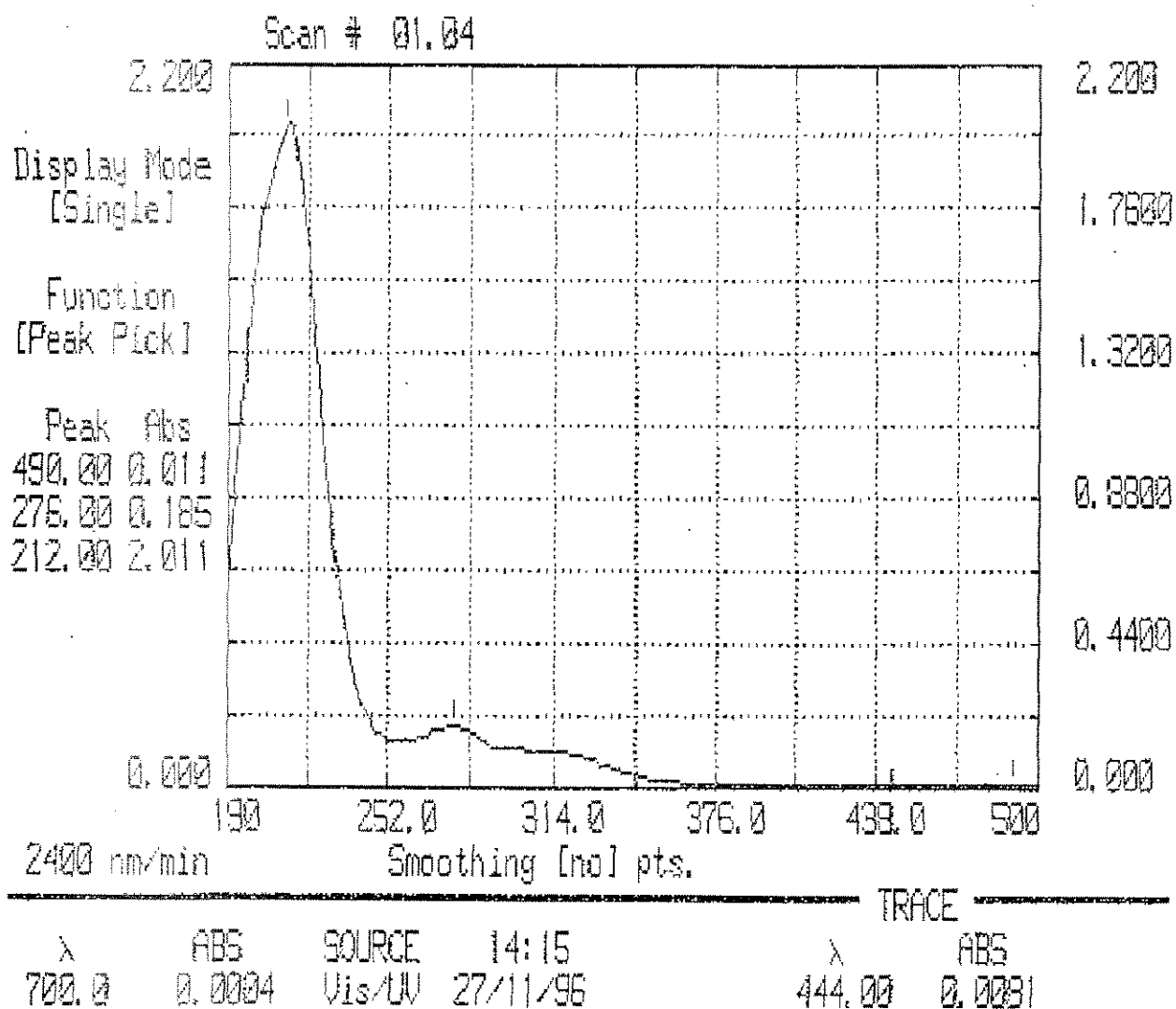


Figura D.9 Absorbância do espumado de uma solução de quilaia 80 mg/L lida em Espectrofotômetro Berekman DU 70 (branco ACN/Água (30/70))

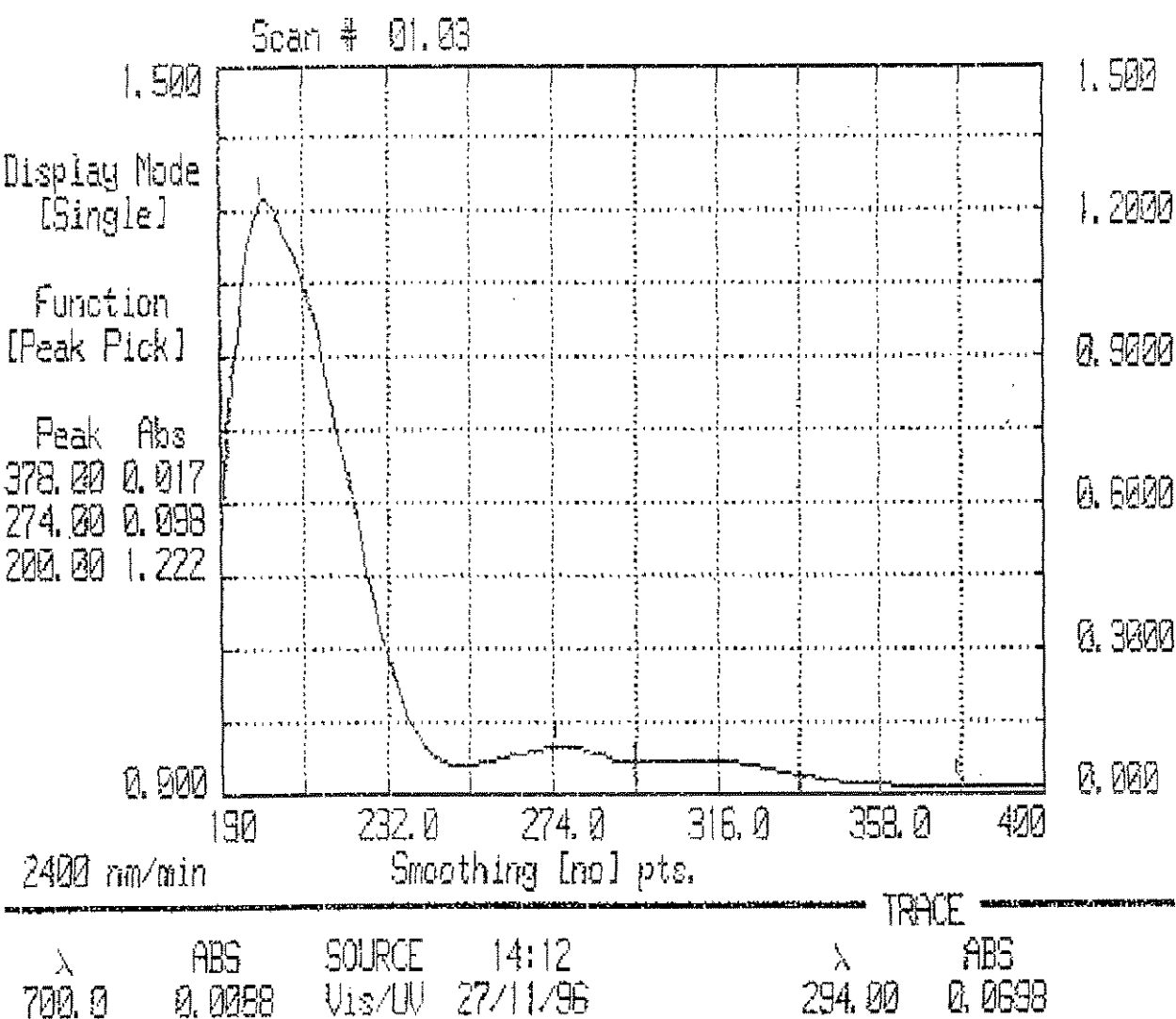


Figura D.10 Absorbância da Solução de Quilaia 80 mg/L lida em Espectofotômetro Berckman DU 70(branco:ACN/Água (30/70))

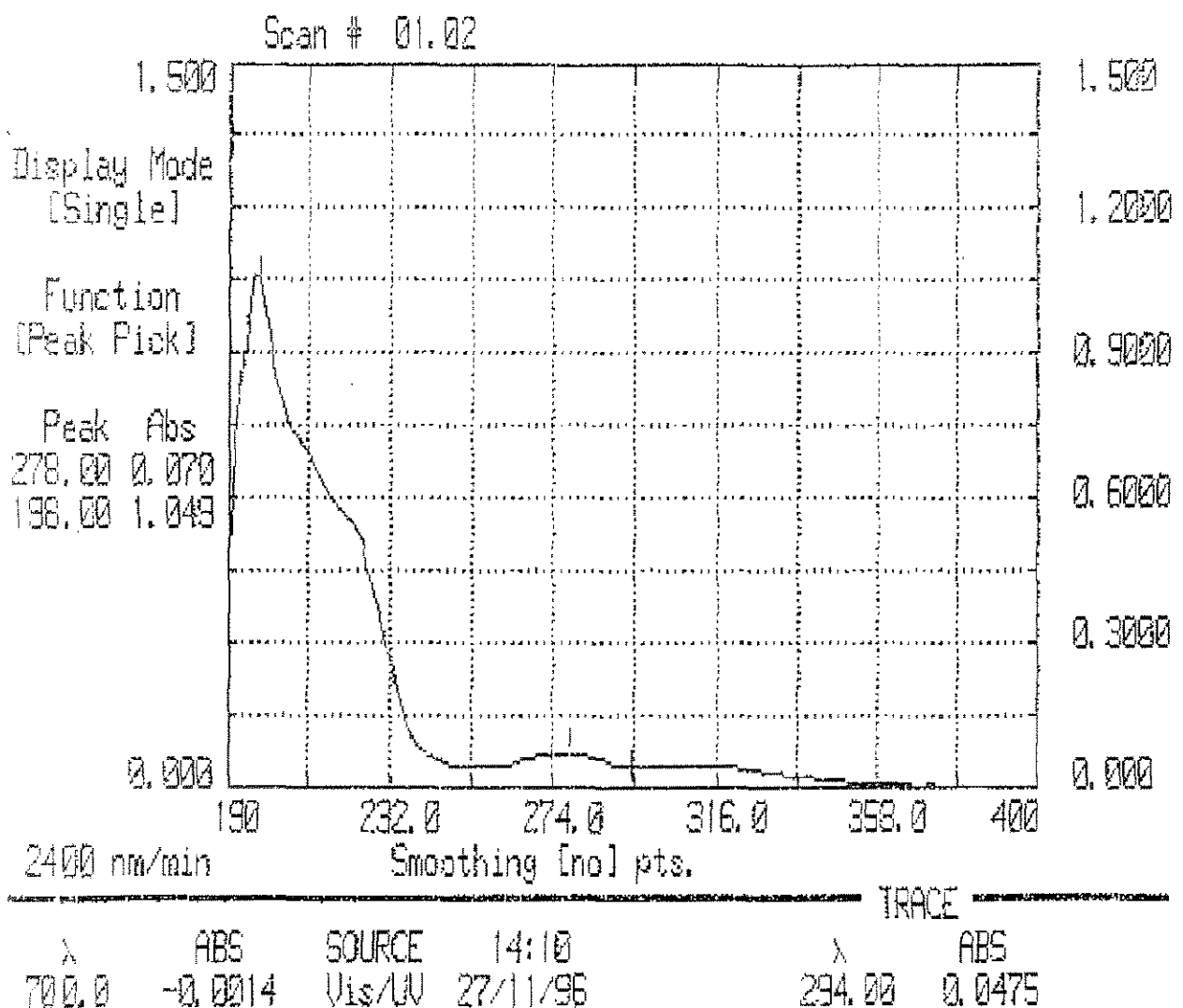


Figura D.11 Absorbância da Solução Residual de um fracionamento em coluna de espuma de uma solução de quilaia, 80 mg/L lida em espectômetro Berckman Du 70 (branco ACN/Água (30/70))

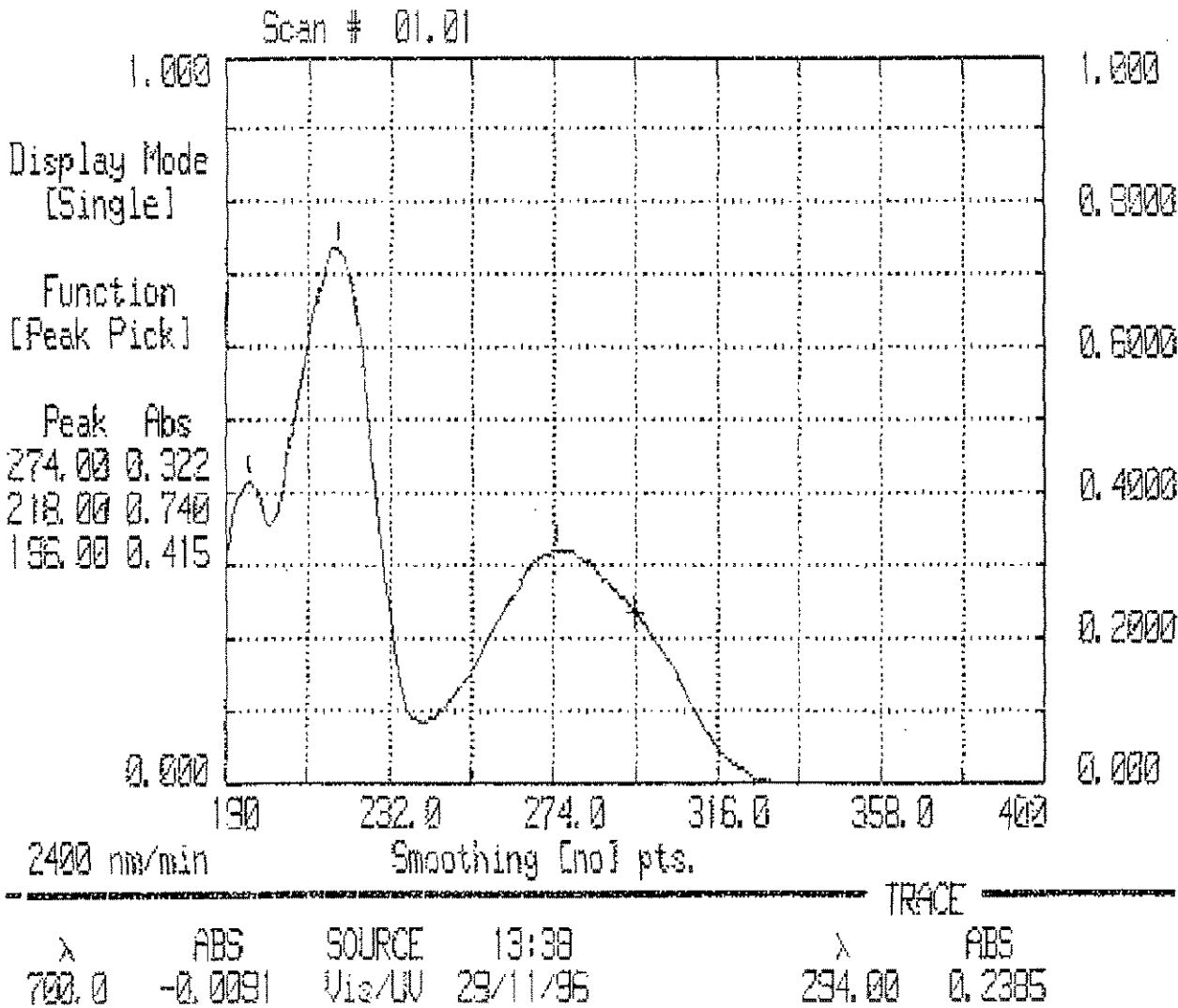


Figura D.12 Absorbância da solução de ácido tânico em acetonitrila lida em espectrofotômetro Berckman DU 70 (branco ACN/Água (30:70))

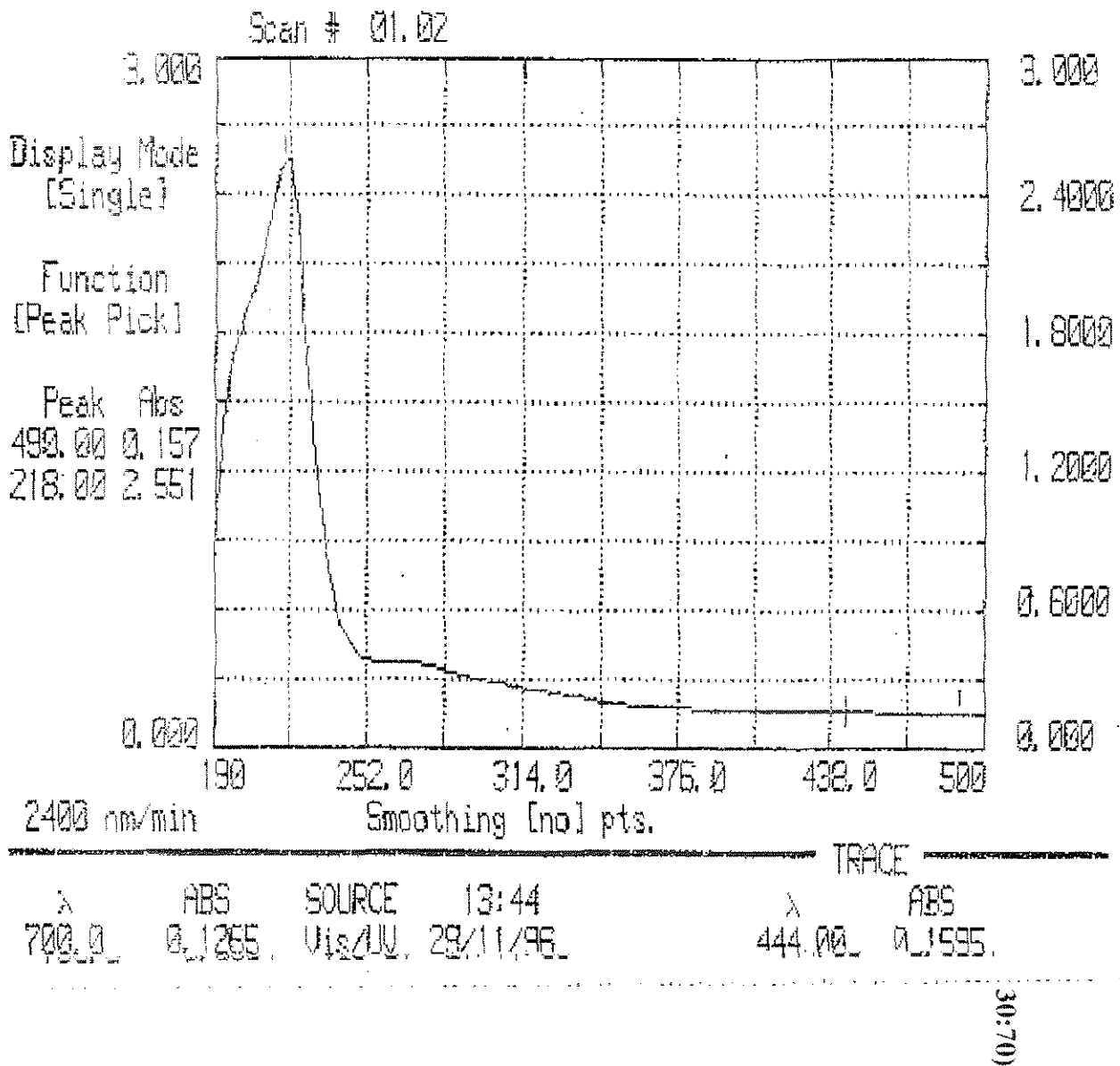


Figura D.13 Absorbância do espumado, de uma solução de quilaia de 80 mg/L, em acetonitrila lida em espectrofotômetro Berckman DU 70 (branco ACN/Água (30:70))

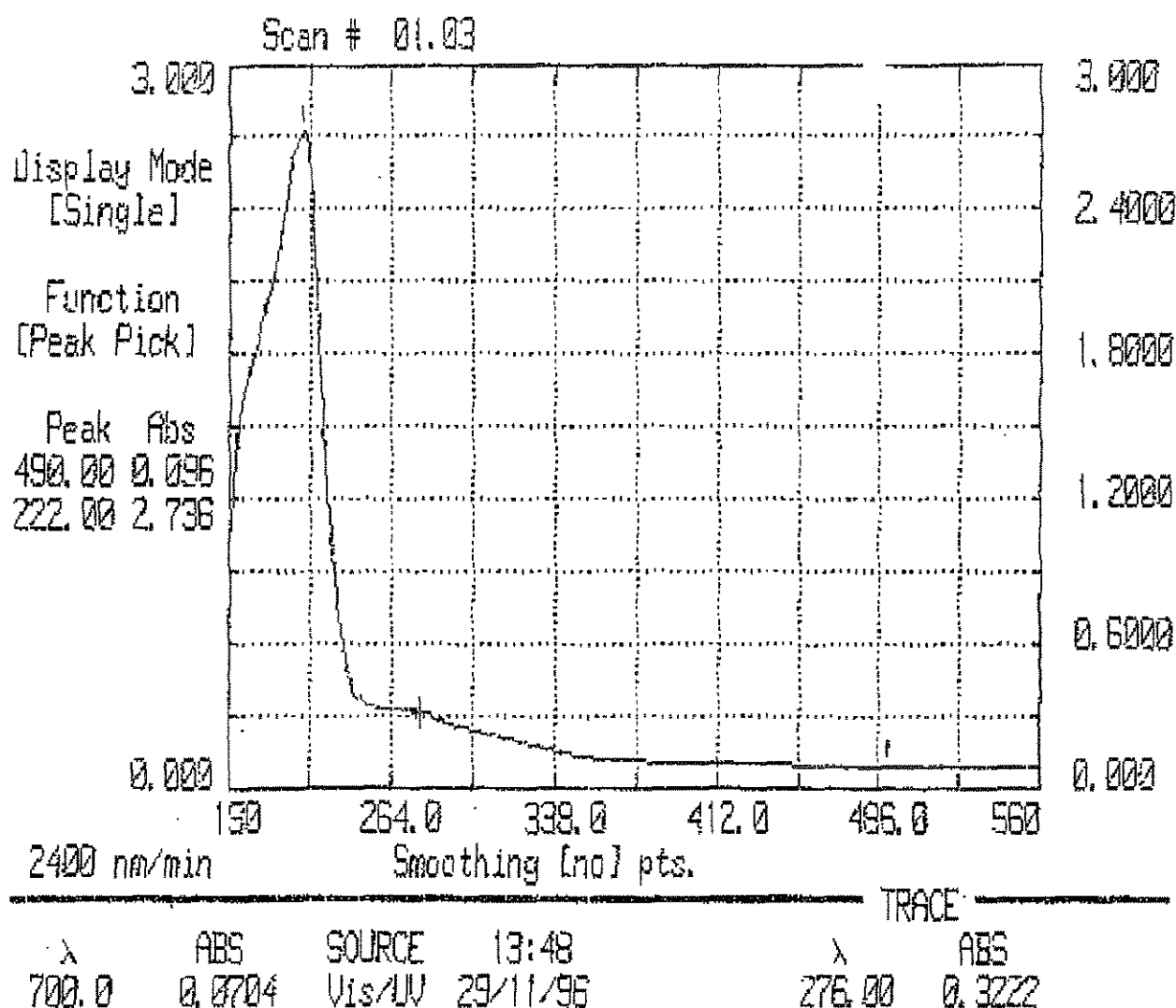


Figura D.14 Absorbância do espumado, de uma solução de quilaia de 80 mg/L, com excesso de ácido em acetonitrila lida em espectrofotômetro Berckman DU 70 (branco ACN/Água (30:70))